



Title	Clinicopathological significance of PAICS expression in colorectal cancer(本文)
Author(s)	小林, 祐介
Citation	
Issue Date	2015-03-24
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/620
Rights	Fulltext: This is the pre-peer reviewed Japanese version of "PLoS One. 2021 Feb 17;16(2):e0247169. doi: 10.1371/journal.pone.0247169. © 2021 Kobayashi et al.", used under CC BY 4.0
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2023-05-05T14:01:10Z

Clinicopathological significance of *PAICS* expression in colorectal cancer

(大腸癌患者における PAICS 遺伝子の発現解析とその臨床的意義)

福島県立医科大学 器官制御外科学講座
小林祐介

要旨

【目的】 *PAICS* (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase/phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)は、プリン
の生合成に働く重要な酵素であり、癌に対する分子標的治療への応用が期待さ
れている。今回われわれは、大腸癌における *PAICS* 遺伝子の発現を解析し、臨
床病理学的背景因子や予後との関連を検討した。

【方法】 大腸癌患者 83 症例を対象に切除検体の癌組織と正常粘膜組織における
PAICS 遺伝子の mRNA 発現解析をリアルタイム RT-PCR 法で行った。次いで、
大腸癌患者 258 症例を対象に、免疫組織化学染色法で *PAICS* の癌組織における
発現を調べ、臨床病理学的背景因子や予後との関連について検討した。また、
大腸癌における *PAICS* 発現の生物学的意義を調べるため、大腸癌培養細胞株 8
株のうち、*PAICS* mRNA の発現が比較的高い HCT116 細胞株を用いて siRNA 法
で *PAICS* の発現をノックダウンし、形態、浸潤能、細胞増殖の変化を検討した。
さらに、公開されているデータベースを用いて、大腸癌における *PAICS* 発現と
関連する遺伝子の変異や予後との関連についても解析した。

【結果】 *PAICS* mRNA 発現が、癌組織で正常粘膜組織に比べて有意に亢進して
いた ($P<0.0001$)。また、免疫組織化学染色では、258 例中 142 例 (55%) で癌
組織に *PAICS* の強い発現を検出した。その発現は、主に癌細胞の細胞質に認め
られた。*PAICS* 発現は、組織型との関連が認められた ($P=0.049$)。また、*PAICS*
発現陽性例と陰性例の予後を比較すると、Stage III の大腸癌患者において、*PAICS*
発現陰性例全体の予後が、発現陽性例に比較し、有意に予後が悪かった ($P=0.015$)。
siRNA 法によって *PAICS* をノックダウンした結果、コントロールと比較して、
細胞の形態や増殖能に違いは認められなかったが、浸潤能において亢進してい
た。データベースの解析結果から、大腸癌における *PAICS* 発現は、マイクロサ

テライト不安定性（MSI）と有意な関連を認め、MSI-High 症例の方が MSI-Low/MSS 症例に比べて、発現が高かった。また、PAICS 発現と予後についてもすべてのデータベースで Stage III の大腸癌患者において、PAICS 発現陰性例全体の予後が、発現陽性例に比較し、有意に予後が悪かった。

【結語】われわれは、PAICS の発現は大腸癌組織で正常粘膜組織に比べて有意に亢進していることを見出した。また、Stage III 症例において PAICS の発現陽性症例の方が陰性症例に比べて予後が良好であることがわかった。このことは、大腸癌培養細胞株を用いて PAICS 遺伝子のノックダウンにより、細胞の浸潤能が亢進したことと関連があると考えられた。データベースの結果は、PAICS の発現が MSI status との関連があることを示すとともに、今回のわれわれの結果と同じく Stage III 症例で PAICS の発現陰性例で予後不良であったことから、PAICS 遺伝子は、進行大腸癌の予後予測マーカーとなりうることが示唆された。

はじめに

大腸癌は、世界で肺癌や乳癌に次いで3番目に罹患率の多い癌であり、世界中で毎年約123万人が発症し60万人が死亡している¹⁾。日本においても、大腸癌の罹患率は、この数十年の間で欧米と肩を並べるほどになっている²⁾。1年間に約12万が罹患し、5万人が亡くなっており、女性で癌での死亡数の1位になっている。大腸癌の診断や治療の技術的な進歩は、早期発見・早期治療につながり根治性や生存期間の延長に寄与しているのは確かである。しかし、一方で進行癌においては、再発転移や切除不能というケースに対し、半数程度の症例は化学療法の治療効果が得られないのが現状であり、さらなる治療の標的分子の発見が期待されている。

プリンは、RNAやDNAの合成、酵素活性の調節、タンパクの合成と機能、エネルギー代謝、エネルギー伝達、補酵素としての機能、細胞伝達など細胞の営みにおいて様々な働きに関与するため、体に必須な分子である。このプリンは、*de novo* プリン生合成経路（PPRPからIMP）によって与えられる。この生合成経路において、重要な2機能性をもつ酵素が、PAICS (Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase/phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)である。PAICSはこの過程の6,7番目のstepを触媒する³⁻⁷⁾。癌細胞は、細胞機能に必要なAMP、GMPの獲得を、この*de novo* プリン生合成経路に依存している⁴⁾。この経路を不活化することによって、生体外、生体内で癌細胞の増殖を抑制することができると考えられている⁶⁾。

そこで我々は、癌細胞の増殖に関わる合成経路の酵素であるPAICSに着目した。PAICSのmRNA発現が解析ソフトのOncomineで、様々な癌において過剰発現していることを解析されているが⁵⁾、PAICSの生物学的機能、PAICSの発現と癌患者の予後や臨床病理学的背景因子との関連について調べた報告は皆無で

ある。

そこで今回、大腸癌における *PAICS* 遺伝子の発現を調べ、*PAICS* の発現と臨床病理学的背景因子や予後との関連を解析した。さらに、大腸癌培養細胞株を用いて、大腸癌における *PAICS* 発現の生物学的意義を検討した。

大腸癌症例と研究方法

大腸癌臨床検体

本研究では、1990 年 1 月から 2007 年 12 月までの期間に当科で手術を施行した大腸癌症例の臨床検体 258 例を用いた。このうち、凍結標本より RNA が抽出できた 83 症例については、mRNA の発現解析に用いた。本研究の実施にあたっては、患者にインフォームドコンセントを行い研究への同意が得られており、当施設の規定に従って倫理委員会の承諾を得ている。(承認番号 2117)

大腸癌細胞株

8 種類のヒト大腸癌培養細胞株 Colo201、HCT15、HCT116、LS180、RKO、SW480、SW620、SW837 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)を用いた。大腸癌細胞株の培地は、ATCC の推奨培地にしたがって RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、あるいは DMEM (Life Technologies, Carlsbad, USA)を使用し、それぞれに 10% fetal bovine serum (NICHIREI BIOSCIENCES, Tokyo, Japan)を添加した。すべての細胞株は、5%CO₂、37℃で培養した。

大腸癌における *PAICS* 遺伝子の mRNA 発現解析

癌組織と正常粘膜組織の凍結組織が得られた 83 例のうち、最初の 5 例 (Case 1~5) を対象に *PAICS* 遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。手術にて

摘出され直ちに凍結保存された検体から癌組織と正常粘膜組織をそれぞれ約 5 mm 角の大きさの切片とし、1ml の Trizol Reagent (Life Technologies)に入れ、ホモジェナイザーを用いて破碎した。クロロホルム 200 μ l を加えたのち、12,000 rpm、15 分間遠心した。最上層の透明の液体部を回収し、500 μ l のイソプロパノールを加え 12,000 rpm、10 分間遠心した。上清を破棄した後、ペレットに 75%エタノールを 1 ml 加え 12,000 rpm、5 分間遠心して上清を破棄し、DNase と RNase を含まない水に溶解して total RNA 溶液とした。Super script III cDNA synthase kit (Life Technologies)を用い、付属手順書に従って、Total RNA 5 μ g から random hexamer をプライマーとして cDNA を合成した。

続いて、KAPA taq Extra HotStart ReadyMix with dye (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を用い、プロトコールに従い *PAICS* 遺伝子と内部標準コントロールとして β -actin (*ACTB*)の PCR を施行した。使用したプライマーは、下記の通りである。

PAICS F: tgccttcaccagaaaatgtg R: tctgttgcttcgatctcct

ACTB F: gctcgtcgtcgacaacggctc R: caaacatgatctgggtcatcttctc

PCR の条件は、最初に 94°C 5 分間変性させ、その後 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 1 サイクルとして、*PAICS* では 35 サイクル、*ACTB* は、28 サイクル行った。PCR 産物を 1%アガロースゲル(エチジウムブロマイド含有)で電気泳動し、Case 1~5 について正常粘膜組織 (N) と癌組織 (T) における発現を比較した。

さらに、大腸癌 83 例を対象に、リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の発現解析を行った。Fast Start Universal Probe (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)を用いて反応液を調製し、7500 Real-time PCR system (Life Technologies)を用いて測定を行った。PCR 条件は 50°C で 2 分間、続いて 95°C で 10 分間の初期変性を行い、95°C で 15 秒間、次いで 60°C で 1 分間の反応を 40 サイクル繰り返し行った。各遺伝子の mRNA 発現量は *ACTB* の mRNA 発現量を内部標準コントロールとし、 $\Delta\Delta Ct$

法にて定量した。測定は各々3回施行し、その平均で示した。PAICS、ACTBのプライマーは、Life Technologies からそれぞれ Hs00272390_m1、Hs99999903_m1 を購入し使用した。

免疫組織化学染色法による PAICS 発現と臨床病理学的背景因子および予後との関連

大腸癌 258 例を対象に、免疫組織化学染色法 (Immunohistochemical staining; IHC) にて PAICS の発現を検討した。手術摘出標本を 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋されたブロックは 4 μm で薄切、キシロールによる脱パラフィン後、エタノール、次いでリン酸バッファー液 (pH 7.2) に置換した。0.3%過酸化水素を添加したメタノールに浸けて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、Protein Block (Dako, Tokyo, Japan) にてブロッキングした。一次抗体として抗ヒト PAICS ポリクローナル抗体 (Abcam, Tokyo, Japan) を希釈倍率 1:400 として使用し、二次抗体として Envision/HRP 標識ウサギ一次抗体用試薬 (Dako) を用いて免疫染色を行った。発色には DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 発色基質を用いた。PAICS 抗体による IHC の結果は以下のように評価した。発現は主に細胞の細胞質に認められたことから、細胞質に染まりが認められる細胞を陽性細胞とした。陽性細胞の比率は、200 μm \times 200 μm の領域を任意に 3 箇所選び、癌組織では癌細胞、正常組織では腺腔を形成する細胞から陽性細胞の占める割合を算出した。陽性染色がある細胞の割合、20%以上の場合を陽性とし、20%未満の場合は陰性と判断した。性別、年齢、深達度、所属リンパ節転移、肝転移、組織型(分化型癌、未分化型癌)、リンパ管侵襲、静脈侵襲、局在部位(結腸、直腸)および stage について各臨床病理学的因子と PAICS の発現の相関について検討した。なお、深達度・所属リンパ節転移の有無・同時性遠隔転移の有無・TNM 分類の stage

については TNM 分類第 7 版に従って表記した。リンパ管侵襲・静脈侵襲については大腸癌取り扱い規約第 7 版補訂版に従い表記した。

大腸癌培養細胞株における *PAICS* mRNA の発現解析

各大腸癌培養細胞株を培養し、80%コンフルエントの状態に回収し前述した TRIzol を製品の説明書に従って用い、total RNA を抽出した。クロロホルム 200 μ l を加えたのち、12,000 rpm、15 分間遠心した。3 層に分かれた最上層のみを回収し、500 μ l のイソプロパノールを加え 12,000 rpm、10 分間遠心した。上清を破棄した後、ペレットに 75%エタノールを 1 ml 加え 12,000 rpm、5 分間遠心し、上清を破棄し、DNase と RNase を含まない水に溶解し total RNA 溶液とした。続いて各サンプルの Total RNA 5 μ g から Super script III cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)を使い、Random hexamer を用いてプロトコールに従い cDNA を合成した。合成した cDNA と前述した *PAICS*、*ACTB* のプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR 法による解析を行った。

Western blotting

各大腸癌培養細胞株を培養し、80%コンフルエントの状態に培地を吸引後、4°C に冷却した DPBS (Life Technologies)で2回洗浄し回収した後、15000rpmで遠心しペレットを-80°Cで一晩保管した。ペレットは4°Cの状態、Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail(100 \times) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)を含む RIPAバッファーで溶解させ、超遠心 (4°C、15000rpm、20分) をかけ精製した。タンパク濃度はBradford reagent (BIO RAD, Hercules, CA, USA) を用いて、Smart Spec 3000 (BIO RAD)で測定した。電気泳動はSDS-PAGE法にて施行した。精製したタンパクに、Novex Tris-Glycine SDS sample buffer (Life Technologies)、及び

3-Mercapto-1,2-propandiol (Wako, Osaka, Japan)を混和した後、100℃で3分間加熱した。その後、4-12% Bis-Tris gels (Life Technologies)に充填し、MES SDS running buffer (Life Technologies)で満たしたX Cell SureLock (Life Technologies)内で、100Vで90分間泳動させた。電気泳動後、iBlot Dry Blotting System (Life Technologies)にてニトロセルロース膜へ転写させ、Starting Block (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific)にてブロッキングした。1次抗体として、それぞれラビット抗PAICSポリクローナル抗体 (abcam)、マウス抗 β -actinモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)を用い、60分間反応させた。2次抗体としてそれぞれヤギ anti-ウサギ IgG-HRP (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology)、ヤギ anti-マウス IgG-HRP (sc-2031, Santa Cruz Biotechnology)を用い、30分間反応させた。希釈バッファーには、Tris Buffered Saline with Tween20 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を用いた。発色抗体にはSuper Signal West Pico detection system (Thermo Fisher Scientific)を用いた。画像解析にはLAS-4000 IR MultiColor (FUJI, Tokyo, Japan)を用いた。

PAICS 発現のノックダウン

PAICS の発現をノックダウンするための siRNA は、Life Technologies 社から PAICS Stealth Select RNAi™ siRNA HSS116338 (PAICS-siRNA1)と HSS116339 (PAICS-siRNA2) の 2 種類のオリゴを購入し実験に用いた。コントロールは Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Hi GC (Life Technologies) (Control-siRNA)を使用した。ノックダウンした細胞は、リアルタイム RT-PCR 法にて大腸癌培養細胞株の中でも PAICS の発現が比較的高い HCT116 を用いた。6 well プレーートの各 well に 3×10^5 個の細胞をまき、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies)を用いて、20 nM の PAICS とコントロールの siRNA オリゴを各々遺伝子導入した。

細胞は 72 時間培養した後に回収した。ノックダウンの確認は、回収した細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成しリアルタイム RT-PCR にて行うとともに、タンパクを抽出し、Western blotting にてタンパク発現を確認した。

PAICS のノックダウンによる細胞の増殖

大腸癌培養細胞株 HCT116 を用いて、PAICS siRNA でノックダウンした細胞とコントロールの細胞の増殖を Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (DOJINDO, Kumamoto, JAPAN)を用いて評価した。播種前の細胞数については Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies) を用いカウントした。まず、24 時間前に 96 well プレートに 100 μ l の培養液とともに 2000 個/well となるように HCT116 をまいて、PAICS-siRNA1, PAICS-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入した。導入後 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間にかく well に 10 μ l の CCK-8 溶液を添加した。5% CO₂、37°C で 1 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (Benchmark Plus, BIO RAD) で 450nm の吸光度を計測した。

PAICS ノックダウンによる細胞の浸潤能の変化

大腸癌培養細胞株 HCT116 と SW480 を用いて、6 well プレートに 24 時間前に播種し、PAICS-siRNA1, PAICS-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、48 時間後に、水和 (PBS0.5ml/well 37°C, CO₂ 非存在下, 2 時間) した BD bioCoat™ Tumor Invasion System 24-Multiwell Insert Plate 8.0 Micron (LOT:3149528, BD biosciences, San Jose, CA, USA) のインサートウェルに 500 μ l の培養液 (RPMI (0%FBS)) とともに 3 \times 10⁴ 個/well となるように播種した。下部のチャンバーには RPMI (5%FBS) を 750 μ l ずつ加えた。コントロールとして、HTS Fluoroblok™ Multiwell Insert System (REF351158, BD biosciences) に同様に播種した。37°C、5% CO₂ 環境

下で 20 時間インキュベート後、Calcein AM (4 μ g/mL AM-HBSS)で同環境下に 1 時間インキュベートし、蛍光強度が励起/測定波長：485/530nm で下方励起下方測定型蛍光プレートリーダーにて測定した。データは浸潤した細胞の平均蛍光強度で比較した。

PAICS ノックダウンによる 5FU 代謝酵素の mRNA expression 変化

大腸癌培養細胞株 HCT116、RKO、SW480、SW837 を用いて、PAICS-siRNA1, PAICS-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、72 時間後に回収した。Trizol Reagent (Life Technologies)で total RNA から cDNA を合成し、*PAICS* の mRNA 発現がノックダウンされていることを RT-PCR で確認した。その検体を用いて、5FU の代謝酵素である Thymidylate synthase (Hs00426586_m1)、thymidine phosphorylase (Hs00157317_m1) 、dihydropyrimidine dehydrogenase (Hs00559279_m1), orotate phosphoribosyltransferase (Hs00923517_m1)の Probe (Life Technologies)を用いて、各酵素の mRNA の発現を解析した。

***PAICS* mRNA expression と MSI、signaling、DFS との関係**

公開されている 6 つのデータベース(GSE41258⁸⁾、TCGA⁹⁾、GSE39582¹⁰⁾、GSE22682¹¹⁾、GSE30378¹²⁾、GSE24551¹³⁾)を利用して、*PAICS* mRNA expression と、stage、MSI (microsatellite instability) status (MSI-H と MSI-L/MSS)、P53 status(Wild type と Mutant type)、KRAS status(Wild type と Mutant type)、BRAF status (Wild type と Mutant type)、DFS との関係を解析した。TCGA のデータベースを用いて、PAICS siRNA mRNA expression と、MSI、WNT signaling、TGF- β signaling、RTK-RAS signaling、PI3K signaling、P53 signaling との関係を比較した。

統計解析

実験は、同様の方法で3回繰り返し行い、結果を統計学的に解析した。2群間の発現解析には、*t* 検定を行い、PAICS の発現と臨床病理学的背景因子との関連は χ^2 検定、Mann-Whitney 検定を用いて統計処理を行った。生存分析は、Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、log-rank 検定を行った。*P* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意差ありと判定した。統計処理は GraphPad PRISM Ver.5.03 (Graphpad software, La Jolla, USA)、StatMate V (株式会社アトムス) にて行った。

結果

大腸癌臨床検体における PAICS 遺伝子の mRNA 発現解析

大腸癌症例の正常粘膜組織と癌組織の mRNA 発現程度を比較検討した結果、内部コントロールとした *ACTB* の発現に対して PAICS の発現が、5 例中 4 例 (Cases 1, 3, 4, 5) で正常粘膜組織に比べて癌組織で発現が亢進していた (Fig. 1A)。さらに大腸癌 83 症例を用いたリアルタイム RT-PCR の解析の結果、PAICS mRNA の発現は、正常組織に比べて癌組織で有意に亢進していた ($P < 0.0001$) (Fig. 1B)。

大腸癌症例における PAICS の発現と臨床病理学的背景因子・予後との関連

IHC による PAICS の発現は、癌細胞に認め、正常粘膜細胞には発現を認められなかった。Fig. 2 に典型的な染色パターンを示した。強発現例 (Fig. 2a) では癌細胞に強い染色性を呈し、主に細胞質に認められた。弱発現例 (Fig. 2b) は一部の癌細胞への染色性を呈し、発現がほとんど認められなかった症例を陰性とした (Fig. 2c)。いずれの対応する正常粘膜細胞には発現を認められなかった (Fig. 2d, 2e, 2f)。大腸癌 258 例の IHC の結果、PAICS の発現は 142 例 (55.5%) に認

められた (Table 1)。発現陽性 142 例と陰性 116 例に分けて、臨床病理学的背景因子との関連を調べた。その結果、組織型において、発現陽性例が陰性例に比較し、分化度が高かった ($P=0.049$) (Table 1)。その他、性別、年齢、深達度、所属リンパ節転移、肝転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、局在部位と PAICS の発現の間には有意な関連は認められなかった (Table 1)。

また、PAICS の発現の有無と生存期間の解析においては、統計学的に有意差は認められなかった (観察期間中央値:1973 日) ($P=0.16$) (Fig. 3A)。進行度 stage III における PAICS 発現の有無と生存期間の解析で、PAICS 発現陽性例が、陰性例に比較し全生存率で予後が良好であった。(観察期間中央値:2164 日) ($P=0.015$) (Fig. 3B)。

大腸癌培養細胞株における PAICS 発現解析

今回調べた大腸癌培養細胞株すべてで mRNA の発現を認めた (Fig. 4A)。PAICS の mRNA 発現レベルは様々であったが、SW837, HCT116, Colo201 がほかの細胞株に比べて発現レベルが高かった (Fig. 4A)。PAICS のタンパク発現では、mRNA の発現レベルが低かった SW620 で検出できなかったが、その他の細胞では発現を認め、HCT116 に比較的高い発現を認めた (Fig. 4B)。

PAICS ノックダウンによる細胞の増殖や形態の変化

大腸癌細胞株の中から PAICS の mRNA とタンパク発現が高かった HCT116 を用いて、PAICS の発現を PAICS-siRNA1 と PAICS-siRNA2 の 2 種類の siRNA オリゴを用いてノックダウンした。その結果、2 種類とも PAICS の mRNA 発現は、コントロール細胞 (Control-siRNA) に比べて、およそ 70%の低下を認めた (Fig. 5A)。また、タンパク発現もコントロールに比べて、ノックダウン細胞で検出で

きないまで発現が減少した (Fig. 5B)。

ノックダウンした細胞の形態に変化は認められなかった。また、PAICS-siRNA1、PAICS-siRNA2 でノックダウンした細胞とコントロール細胞の増殖を比較すると、48 時間後、72 時間後、96 時間後、120 時間後で細胞増殖が減少する傾向を認めるものの統計学的に有意差は得られなかった (Fig. 6)。

PAICS ノックダウンによる細胞の浸潤能の変化

PAICS-siRNA1、PAICS-siRNA2 でノックダウンした HCT116 細胞とコントロール細胞を用いて、浸潤能を調べた結果、PAICS-siRNA2 でノックダウンした細胞で浸潤能がやや亢進する傾向が認められた ($P=0.09$) (Fig. 7A)。SW480 細胞を用いて、同様に浸潤能を調べた結果、PAICS-siRNA2 でノックダウンした細胞で有意に浸潤能が亢進した ($P<0.0001$) (Fig. 7B)。

PAICS ノックダウンによる 5FU の代謝酵素の mRNA expression 変化

大腸癌細胞株 HCT116、RKO、SW480、SW837 を用いて、PAICS-siRNA1、PAICS-siRNA2 でノックダウン後、ノックダウンされていることを RT-PCR で確認した (Fig. 8)。これらの検体で 5FU の代謝酵素である Thymidylate synthase (TS)、thymidine phosphorylase (TP)、dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)、orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) の mRNA の発現を調べた。その結果、TP の mRNA 発現が、ノックダウン後のすべての細胞で低下していた (Fig. 9B)。TS, DPD, OPRT の mRNA 発現に一定の傾向は認められなかった (Fig. 9A, 9C, 9D)。

PAICS mRNA expression と MSI status、癌関連遺伝子変異、予後との関係

GSE41258 で正常組織から polyp、stage I に進むにつれ、*PAICS* の発現が増加し、Stage I から Stage IV に進行するにつれて、*PAICS* の発現が減少している傾向が認められた (Fig. 10A)。また、肺転移巣、肝転移巣ではさらに発現が低くなっていた。*PAICS* の発現は MSI の status との有意な関連を認め、MSI-H 症例 (n=35) の方が MSI-L/MSS 症例 (n=133) と比べて *PAICS* の発現が高かった ($P=0.035$) (Fig. 10B)。*PAICS* の発現と P53 status の違いで有意な関連は認められなかった (Fig. 10C)。*PAICS* の発現と、予後を比較すると、大腸癌患者 (Stage II+III、Stage II、Stage III) おいて、*PAICS* 発現の低い方が有意に予後不良であった (各々 $P=0.0007$, $P=0.03$, $P=0.003$) (Fig. 10D, 10E, 10F)。

TCGA でも *PAICS* の発現は MSI の status との有意な関連を認め、MSI-H 症例 (n=35) の方が MSI-L/MSS 症例 (n=208) と比べて *PAICS* の発現が高かった ($P=0.017$) (Fig. 11A)。その他の WNT signaling、TGF- β signaling、RTK-RAS signaling、PI3K signaling、P53 signaling との関連性を解析すると、その全てにおいて、*PAICS* の発現との関連性は認められなかった (Fig. 11B-F)。

GSE39582 でも *PAICS* の発現は MSI の status との有意な関連を認め、MSI-H 症例 (n=75) の方が MSI-L/MSS 症例 (n=444) と比べて *PAICS* の発現が高かった ($P=0.0002$) (Fig. 12A)。そのほか P53 status (Wild type と Mutant type) (Fig. 12B)、KRAS status (Wild type と Mutant type) (Fig. 12C)、BRAF status (Wild type と Mutant type) (Fig. 12D) との関連性に有意な差を認めなかった。

GSE22682 でも *PAICS* の発現は MSI の status との有意な関連を認め、MSI-H 症例 (n=35) の方が MSI-L/MSS 症例 (n=265) と比べて *PAICS* の発現が高かった ($P=0.0086$) (Fig. 12E)。

GSE30378 と GSE24551 を合わせたデータを用いると、GSE22682 と同様に MSI-H 症例 (n=28) の方が MSI-L/MSS 症例 (n=197) と比べて *PAICS* の発現が

有意に高かった ($P=0.0084$) (Fig. 12F)。

GSE39582 で、*PAICS* の発現と予後を比較すると、大腸癌患者 (Stage II+III、Stage III) おいて、*PAICS* 発現の低い方が有意に予後不良であった (各々 $P=0.001$, $P=0.028$) (Fig. 13A, 13C)。Stage II 症例では、*PAICS* 発現の低い方が予後不良である傾向を認めるものの統計学的な有意差は得られなかった ($P=0.087$) (Fig. 13B)。

また、GSE30378 と GSE24551 を合わせたデータで、*PAICS* の発現と予後を比較すると、Stage III 症例において、*PAICS* 発現の低い方が有意に予後不良であった ($P=0.0002$) (Fig. 14C)。Stage II+III、Stage II の解析では、*PAICS* の発現と予後に相関は認められなかった (各々 $P=0.16$, $P=0.87$) (Fig. 14A, 14B)。

考察

本研究で、大腸癌症例における *PAICS* 遺伝子の mRNA 発現が正常組織に比べて癌組織で有意に亢進していることを見出した。*PAICS* は、プリンの生合成に働く重要な酵素であり、これまで急性リンパ球性白血病¹⁴⁾ や肺癌¹⁵⁾、脳腫瘍¹⁶⁾ で発現が亢進していることが報告されている。われわれの知る限りでは、大腸癌における *PAICS* 遺伝子の発現について調べた報告は皆無であり、その臨床的意義も含めて検討したものとしては本報告が初めてである。さらに、大腸癌臨床検体について IHC を用いて *PAICS* の発現を解析した結果から、*PAICS* は大腸癌の約半数の症例で発現が亢進していることがわかった。臨床病理学的背景因子のうち、組織型において、分化型と未分化型で発現頻度が異なっていた。しかし、大腸癌はもともと分化型が 9 割程度を占め、未分化癌や低分化型が残りの 1 割程度を占めているため、その臨床的意義については限定的である。また、*PAICS* が細胞の分化に直接影響しているとは考えにくい。

PAICS の発現と予後との関連で、stage が混在している全体の症例では、PAICS の発現の有無で有意差は得られなかったものの、stage III 大腸癌症例に限定すると PAICS 発現陰性例が、陽性例に比べて全生存期間で予後が不良になることがわかった。海外のデータベース⁸⁻¹³⁾の解析でもすべてのコホートで stage III 大腸癌症例において、PAICS 発現陰性例が陽性例に比べて予後不良であったことは、われわれの結果を強く支持するものと考えられた。データベースは、PAICS の mRNA 発現で比較しているため、われわれの IHC での発現の有無とは評価方法が異なる。しかしながら、予後との関連で一致していたことから、安価で発現の評価が比較的簡便な IHC で PAICS の発現を調べることにより、stage III 大腸癌症例の予後予測が可能となることが考えられた。

さらに、データベースの解析から、PAICS 遺伝子の発現と大腸癌に関係する細胞伝達シグナリングの軸になる遺伝子 status との関連で、P53、KRAS、BRAF の変異の有無との関連は認められなかったものの、すべてのコホートで MSI status との関連が認められたことは着目すべきことである。MSI-H 症例は、散发性大腸癌の 10~15%程度である。遺伝性大腸癌であるリンチ症候群では、MSI-H であることが診断の補助となり、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列の変異の存在が示唆される。散发性大腸癌の MSI-H 症例は、ミスマッチ修復遺伝子である *MLH1* のプロモーター領域のメチル化異常が原因である。臨床的データでは、MSI-H 症例の方が、MSI-L/MSS 症例に比べて予後が良好であることが知られている¹⁷⁾。このことは、MSI-H 症例が PAICS の発現が高く、MSI-L/MSS 症例では PAICS の発現が低いことと関連があり、今後 PAICS 遺伝子の癌における生物学的な働きを調べていくうえでミスマッチ修復遺伝子との関係から究明していく必要があると考えられた。

本研究では PAICS の大腸癌における生物学的意義を明らかにするため、PAICS

のノックダウン実験を行い、細胞の形態、増殖能、浸潤能について調べた。2種の siRNA オリゴを用いて、ノックダウン細胞とコントロール細胞の変化について検討を行ったが、細胞の形態や増殖能の変化は認められなかった。浸潤能については、PAICS-siRNA2 でノックダウンした HCT116 細胞でコントロール細胞に比べて、亢進している傾向が認められた。そこで、SW480 細胞でも同様に浸潤能を調べた結果、やはり PAICS-siRNA2 でノックダウンした細胞でコントロール細胞に比べて、有意に亢進していた。PAICS-siRNA1 でもノックダウン後の PAICS の mRNA とタンパク発現は、PAICS-siRNA2 同様に著明に減弱していたが、PAICS-siRNA2 でノックダウンした細胞で浸潤能を獲得していた。今回、一過性に PAICS の発現をノックダウンしたが、今後 stable に PAICS の発現をノックダウンした細胞を作製したり、逆に PAICS を過剰発現した細胞を作製したりして、浸潤能の変化を調べていく予定である。

今回の結果で、PAICS 遺伝子の発現と stage III 大腸癌症例の予後との関連が認められた。stage III 大腸癌症例は、根治手術後の再発転移の割合が 30~40%と高いため、大腸癌治療ガイドラインにも記載されている通り、術後に補助化学療法が推奨されている。近年オキサリプラチンを含む FOLFOX や XELOX 療法までも補助化学療法として施行されるようになったが、従来から 5-FU が治療の中心となっていた。そこで、5-FU の効果予測という観点から、5-FU の代謝関連酵素である *TS*, *TP*, *DPD*, *OPRT* の発現に着目されてきた¹⁸⁾。さらに、前述した MSI status と 5-FU の治療効果についても、MSI-H 症例で 5-FU の耐性があることが報告¹⁹⁾されていることから、PAICS 遺伝子の発現と 5-FU の代謝関連酵素の発現に相関がないか検索した。その結果、4 種類の大腸癌培養細胞株すべてで PAICS をノックダウンした細胞でコントロール細胞に比べて、*TP* の mRNA 発現が著明に低下していた。*TS*, *DPD*, *OPRT* 遺伝子の発現変化は一定の傾向は認めら

れなかったことから、*TP* がすべての細胞株で発現が低下していたことは直接的であるか間接的であるかは別として、着目すべき点であると思われた。最近、*TP* の発現が高い症例の方が、低い症例よりも予後が良好であったという報告もあり、今回の siRNA の結果から、*TP* の発現が *PAICS* の発現と正の関連があることが示唆されたことから、*PAICS* 遺伝子の機能と *TP* の発現には関連性があるものと考えられた。

今回われわれは、*PAICS* の発現は大腸癌組織で正常粘膜組織に比べて有意に亢進していることを見出した。また、Stage III 症例において *PAICS* の発現陽性症例の方が陰性症例に比べて予後が良好であることがわかった。このことは、大腸癌培養細胞株を用いて *PAICS* 遺伝子のノックダウンにより、細胞の浸潤能が亢進したことと関連があると考えられた。データベースの結果は、*PAICS* の発現が MSI status との関連があることを示すとともに、今回のわれわれの結果と同じく Stage III 症例で *PAICS* の発現陰性例で予後不良であったことから、*PAICS* 遺伝子は、進行大腸癌の予後予測マーカーとなりうることが示唆された。

引用文献

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–2917.
2. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H and The Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2013;43:328-336.
3. Duval N, Luhers K, Wilkinson TG 2nd, Baresova V, Skopova V, Kmoch S, Vacano GN, Zikanova M, Patterson D. Genetic and metabolomic analysis of AdeD and AdeI mutants of de novo purine biosynthesis: cellular models of de novo purine biosynthesis deficiency disorders. 2013 Mar;108(3):178-89. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.01.002. Epub 2013 Jan 12.
4. Li SX, Tong YP, Xie XC, Wang QH, Zhou HN, Han Y, Zhang ZY, Gao W, Li SG, Zhang XC, Bi RC. Octameric structure of the human bifunctional enzyme PAICS in purine biosynthesis. 2007 Mar 9;366(5):1603-14. Epub 2006 Dec 16.
5. Ng A, Uribe RA, Yieh L, Nuckels R, Gross JM. Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development. 2009 Aug;136(15):2601-11. doi: 10.1242/dev.038315. Epub 2009 Jul 1.
6. McGuire JJ (2003) Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des* 9: 2593–2613
7. Hong Zhao, Jarrod B. French, Ye Fang, Stephen J. Benkovic *Chem Commun (Camb)* Author manuscript; available in PMC 2014 January 2. Published in final edited form as: *Chem Commun (Camb)*. 2013 May 18; 49(40):10.1039/c3cc41437j. Published online 2013 April 11. doi: 10.1039/c3cc41437j
8. Michal Sheffera, Manny D. Bacolod, Or Zuk, Sarah F. Giardinab, Hanna Pincasb, Francis Baranyb, Philip B. Patyd, William L. Geralde, Daniel A. Nottermanf, and Eytan Domanya. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer. *PNAS* April 28, 2009 vol. 106 no. 17 7131-7136
9. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337 (19 July 2012). doi:10.1038/nature11252

10. Laetitia Marisa, Aure' lien de Reynie` s, Alex Duval, Janick Selves, Marie Pierre Gaub, Laure Vescovo, Marie-Christine Etienne-Grimaldi, Renaud Schiappa, Dominique Guenot, Mira Ayadi, Sylvain Kirzin, Maurice Chazal, Jean-Franc,ois Fle'jou, Daniel Benchimol, Anne Berger¹, Arnaud Lagarde, Erwan Pencreach, Franc,oise Piard¹, Dominique Elias, Yann Parc, Sylviane Olschwang, Ge' rard Milano, Pierre Laurent-Puig, Vale' rie Boige. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLOS MEDICINE*. May 21, 2013. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001453
11. Purificacion Estevez-Garcia, Iker Lopez-Calderero, Sonia Molina-Pinelo, Sandra Mu~noz-Galvan, Ana Salinas¹, Lourdes Gomez-Izquierdo, Antonio Lucena-Cacace, Blanca Felipe-Abrio, Luis Paz-Ares, Rocio Garcia-Carbonero, and Amancio Carnero. Spinophilin Loss Correlates with Poor Patient Prognosis in Advanced Stages of Colon Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:3925-3935. Published OnlineFirst May 31, 2013.
12. Anita Sveen, Trude H. Ågesen, Arild Nesbakken, Gunn Iren Meling, Torleiv O. Rognum, Knut Liestøl, Rolf I. Skotheim, and Ragnhild A. Lothe. ColoGuidePro: A Prognostic 7-Gene Expression Signature for Stage III Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2012;18:6001-6010. Published OnlineFirst September 18, 2012.
13. Anita Sveen, Trude H Ågesen, Arild Nesbakken, Torleiv O Rognum, Ragnhild A Lothe and Rolf I Skotheim. Transcriptome instability in colorectal cancer identified by exon microarray analyses: Associations with splicing factor expression levels and patient survival. *Genome Medicine* 2011 3:32.
14. Zaza G, Yang W, Kager L, Cheok M, Downing J, Pui CH, Cheng C, Relling MV, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. *Blood*. 2004 Sep 1;104(5):1435-41.
15. Sun W, Zhang K, Zhang X, Lei W, Xiao T, Ma J, Guo S, Shao S, Zhang H, Liu Y, Yuan J, Hu Z, Ma Y, Feng X, Hu S, Zhou J, Cheng S, Gao Y. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Lett*. 2004 Aug 20;212(1):83-93.
16. Serão NV, Delfino KR, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics*. 2011 Jun 7;4:49.
17. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal

cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1890-6.

18. Kumamoto K, Kuwabara K, Tajima Y, Amano K, Hatano S, Ohsawa T, Okada N, Ishibashi K, Haga N, Ishida H. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase mRNA expression in primary lesions using laser capture microdissection is useful for prediction of the efficacy of FOLFOX treatment in colorectal cancer patients with liver metastasis. *Oncol Lett*. 2012 May;3(5):983-989.
19. Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2003 Aug 10;106(1):66-73.

Figure legends

Figure 1 : A. 大腸癌症例の癌組織と正常組織における *PAICS* 遺伝子の mRNA 発現. N : 正常粘膜組織、T : 癌組織、M : 100bp マーカー

B. 大腸癌患者 83 症例におけるリアルタイム RT-PCR 法による *PAICS* mRNA の発現. N : 正常粘膜組織、T : 癌組織

Figure 2 : 大腸癌臨床検体における *PAICS* の免疫組織学的染色. 上段は癌組織 (a, b, c) であり、下段は同一症例の正常粘膜組織 (d, e, f) です。癌組織における *PAICS* の染色強陽性例 (a)、弱陽性例 (b)、陰性例 (c) を呈示した。

Figure 3 : A. 大腸癌における *PAICS* の発現と予後. 全生存期間を Kaplan-Meier 法で、*PAICS* 発現陽性例 (赤線) と陰性例 (青線) の 2 群間の有意差検定は、Log-Rank test で行った。

B. Stage III の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後. *PAICS* 陽性例 (赤線) が 53 例で、陰性例が 22 例 (青線) である。

Figure 4 : A. 大腸癌細胞培養株における *PAICS* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

B. 大腸癌細胞培養株における *PAICS* タンパクの発現を Western blotting 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

Figure 5 : A. 大腸癌細胞培養株 HCT116 細胞に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、72 時間後に回収した。siRNA 法によるノックダ

ウン後の *PAICS* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

B. siRNA 法によるノックダウン後の *PAICS* タンパクの発現を Western blotting 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

Figure 6 : 大腸癌細胞培養株 HCT116 細胞に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、各細胞数をカウントし、経時的に細胞増殖を解析した。

Figure 7 : A. 大腸癌細胞培養株 HCT116 細胞に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し 48 時間後に浸潤能アッセイを行った。

B. 大腸癌細胞培養株 SW480 細胞に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し 48 時間後に浸潤能アッセイを行った。

Figure 8 : 大腸癌細胞培養株 SW480, SW837, RKO に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、72 時間後に回収した。siRNA 法によるノックダウン後の *PAICS* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

Figure 9 : 大腸癌細胞培養株 HCT116, SW480, SW837, RKO に *PAICS*-siRNA1, *PAICS*-siRNA2, Control-siRNA を遺伝子導入し、72 時間後に回収した。siRNA 法によるノックダウン後の各細胞の(A) *TS* mRNA、(B) *TP* mRNA、(C) *DPD* mRNA、(D) *OPRT* mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。内部コントロールとして β -actin を用いた。

Figure 10 : データベース GSE41258 を用いた解析. (A) 大腸正常組織、腺腫組織、stage 別癌組織の *PAICS* mRNA の発現. (B) *PAICS* mRNA の発現と MSI status との関連. (C) *PAICS* mRNA の発現と P53 遺伝子変異との関連. (D) Stage II と III の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後. (E) Stage II の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後. (F) Stage III の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後.

Figure 11 : データベース TCGA を用いた解析. (A) *PAICS* mRNA の発現と MSI status との関連. (B) *PAICS* mRNA の発現と WNT シグナリングとの関連. (C) *PAICS* mRNA の発現と TGF- β シグナリングとの関連. (D) *PAICS* mRNA の発現と RTK-RAS シグナリングとの関連. (E) *PAICS* mRNA の発現と PI3K シグナリングとの関連. (F) *PAICS* mRNA の発現と P53 シグナリングとの関連.

Figure 12 : データベース GSE39582 を用いた解析. (A) *PAICS* mRNA の発現と MSI status との関連. (B) *PAICS* mRNA の発現と P53 遺伝子変異との関連. (C) *PAICS* mRNA の発現と KRAS 遺伝子変異との関連. (D) *PAICS* mRNA の発現と BRAF 遺伝子変異との関連. (E) データベース GSE22682 を用いた *PAICS* mRNA の発現と MSI status との関連を解析した. (F) データベース GSE30378 と 24551 を用いた *PAICS* mRNA の発現と MSI status との関連を解析した.

Figure 13 : データベース GSE39582 を用いた解析. (A) Stage II と III の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後. (B) Stage II の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後. (C) Stage III の大腸癌患者における *PAICS* の発現と予後.

Figure 14 : データベース GSE30378 と 24551 を用いた解析. (A) Stage II と III の大腸癌患者における PAICS の発現と予後. (B) Stage II の大腸癌患者における PAICS の発現と予後. (C) Stage III の大腸癌患者における PAICS の発現と予後.

Figure 1A

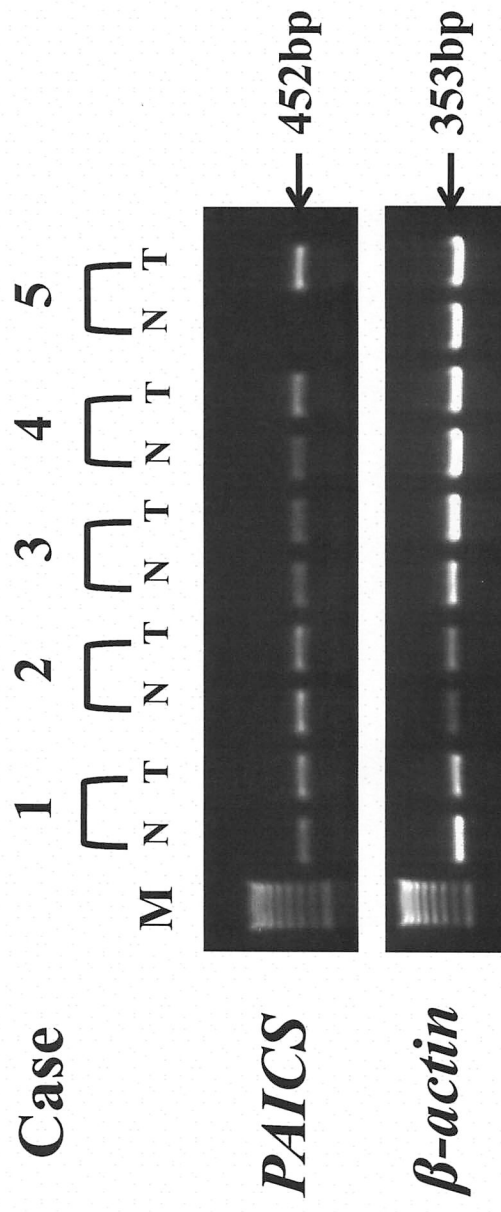


Figure 1B

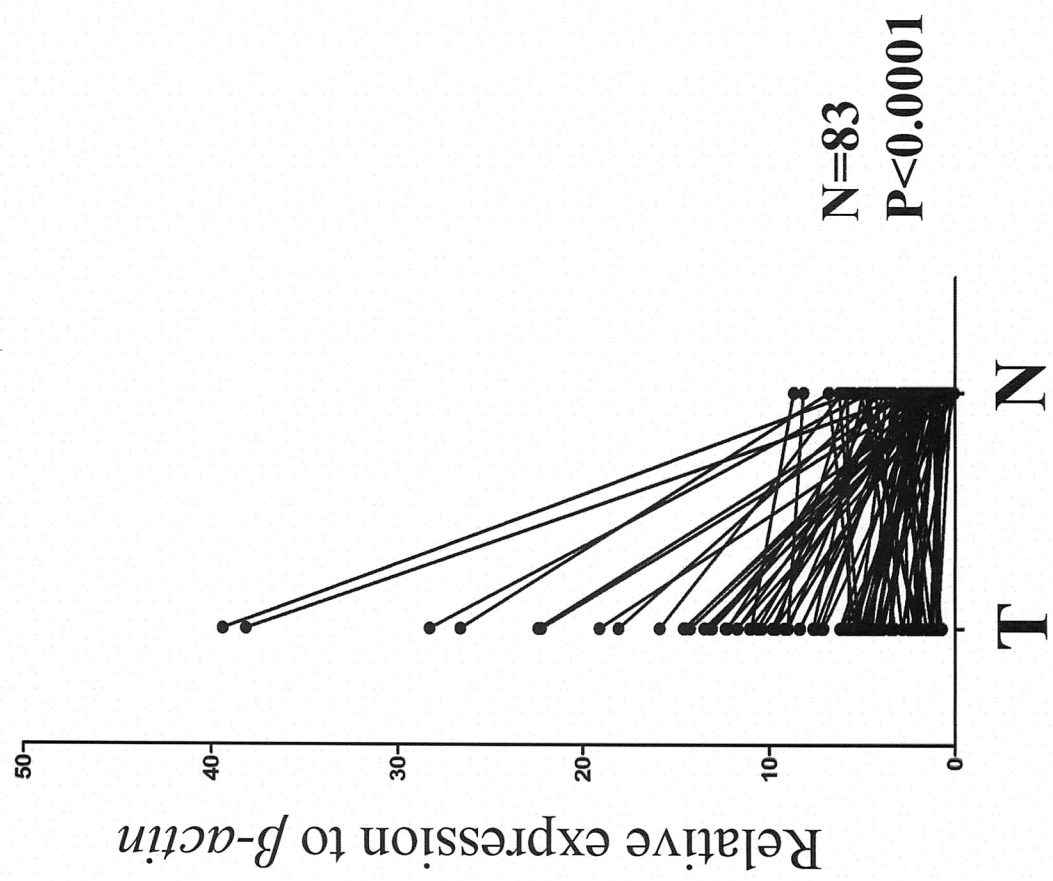


Figure 2

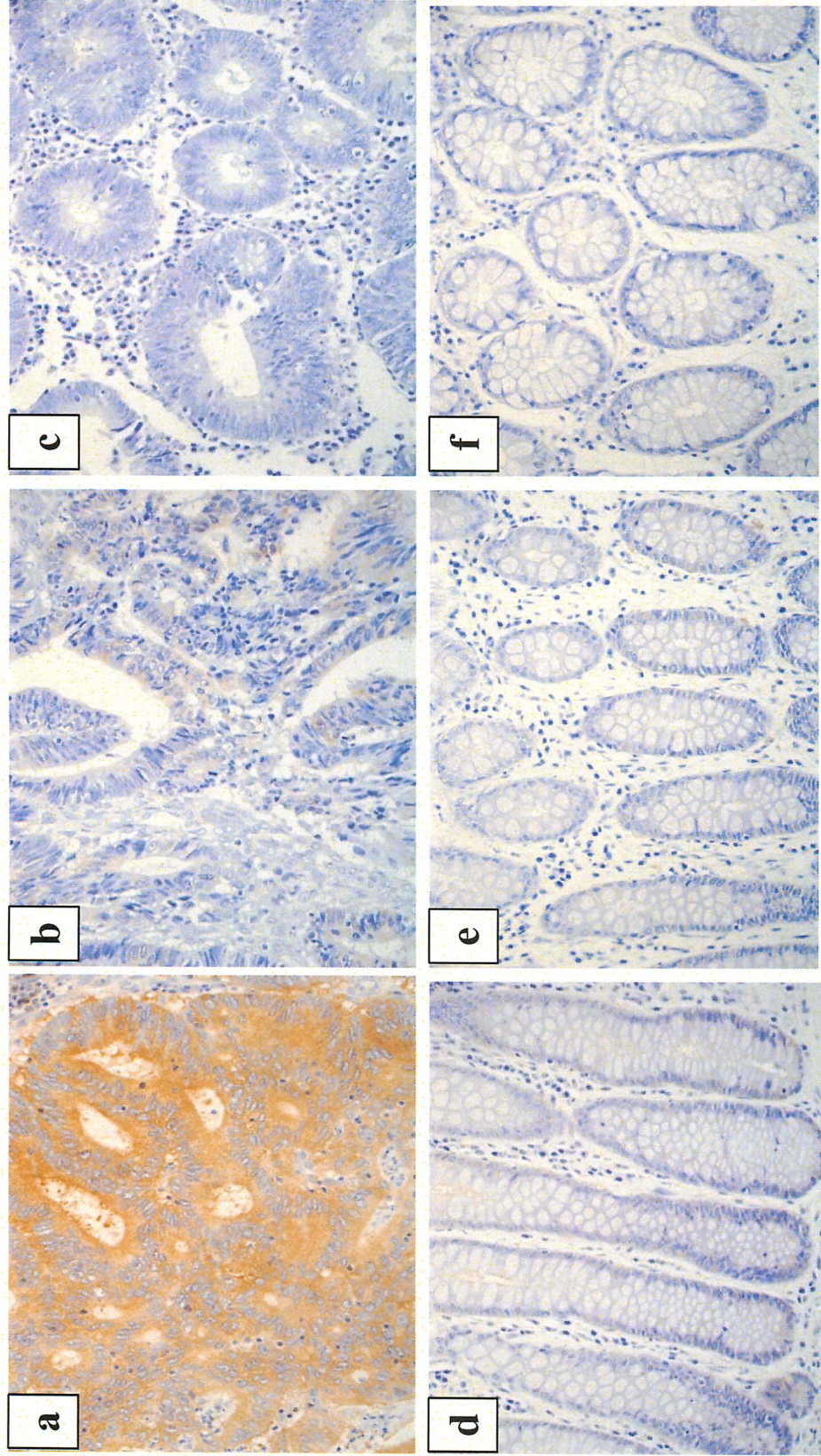


Figure 3A

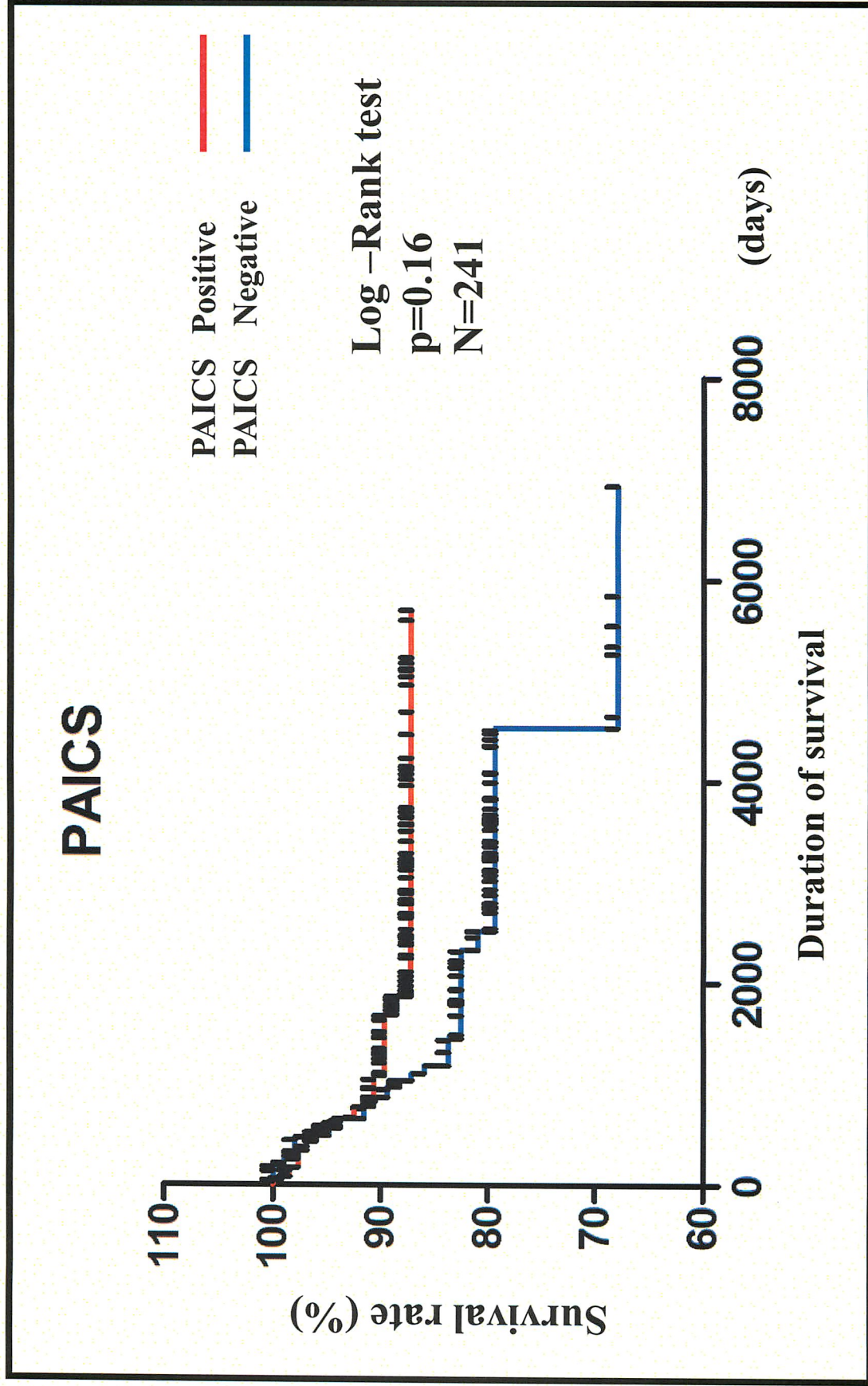


Figure 3B

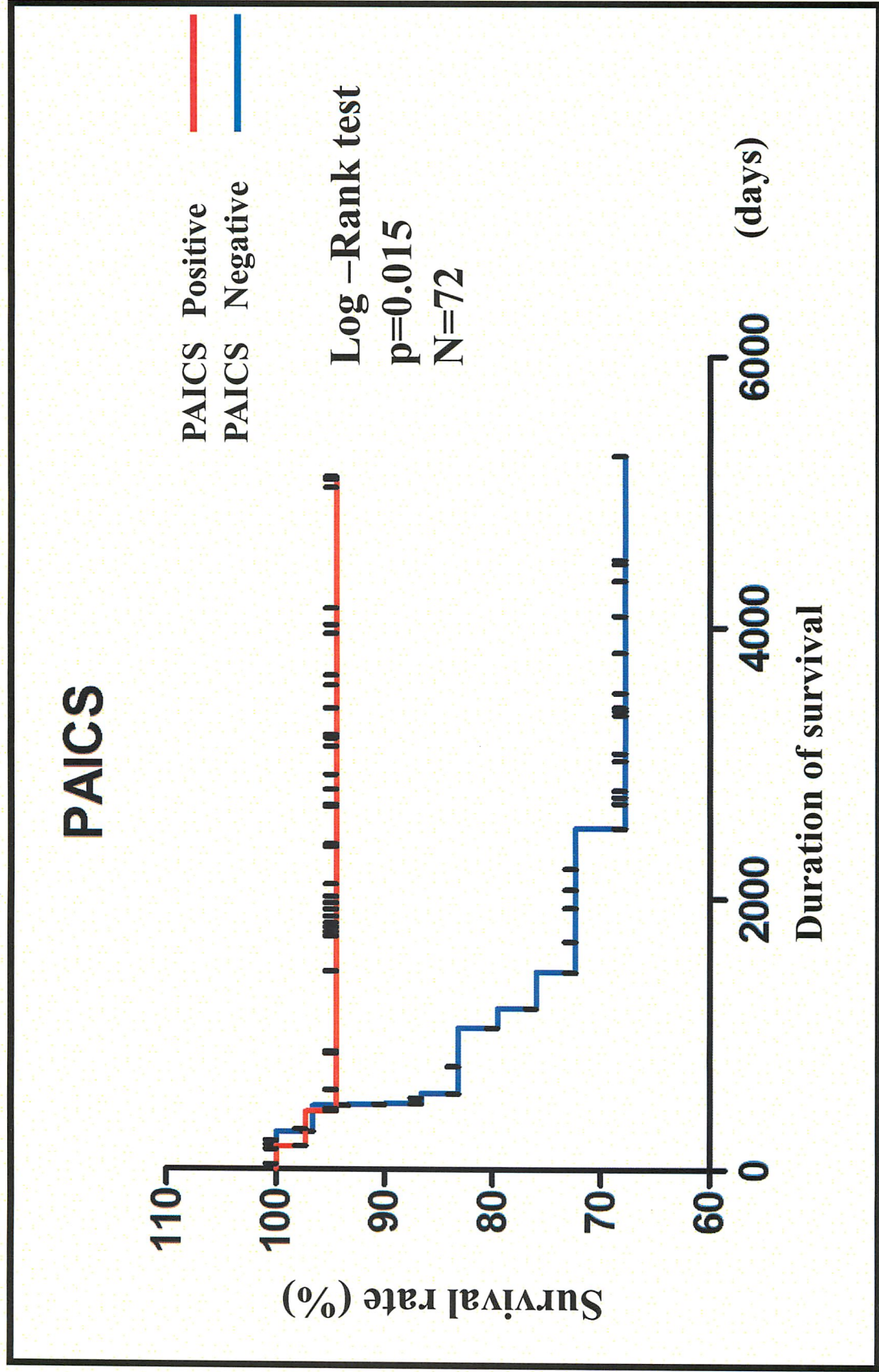
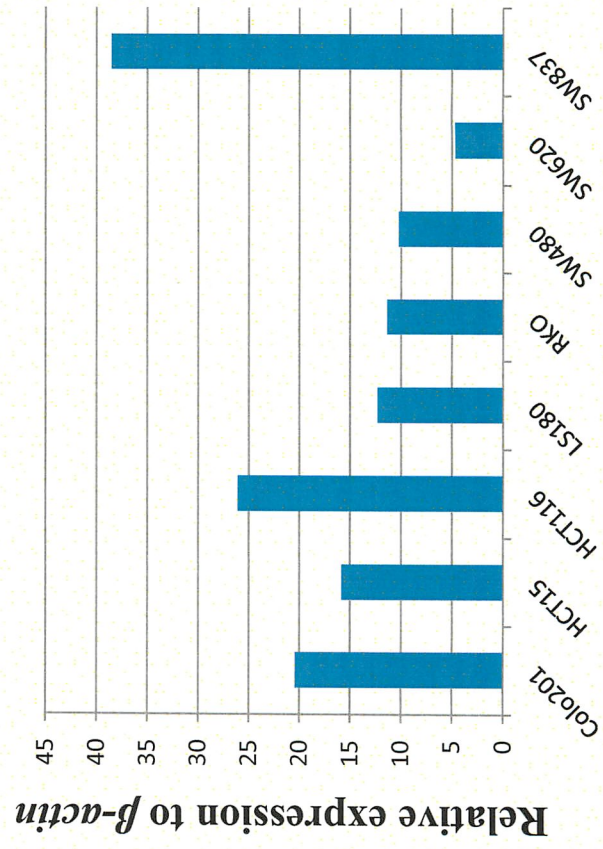


Figure 4

A)



B)

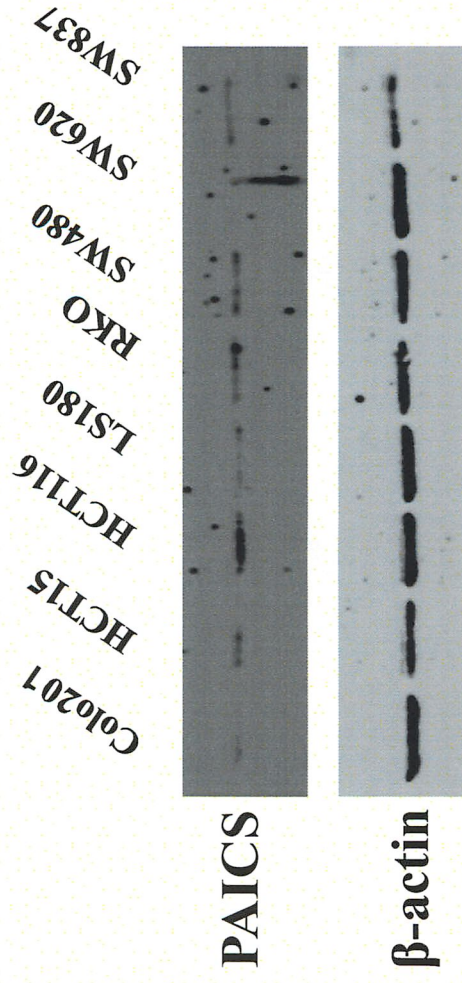
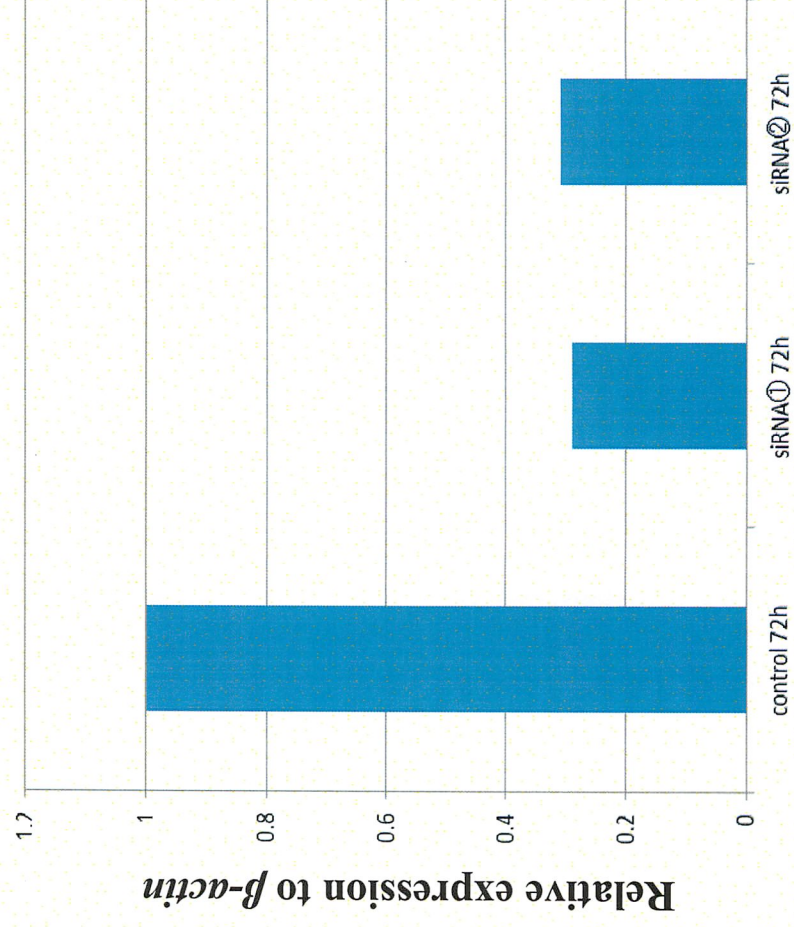


Figure 5

A)



B)

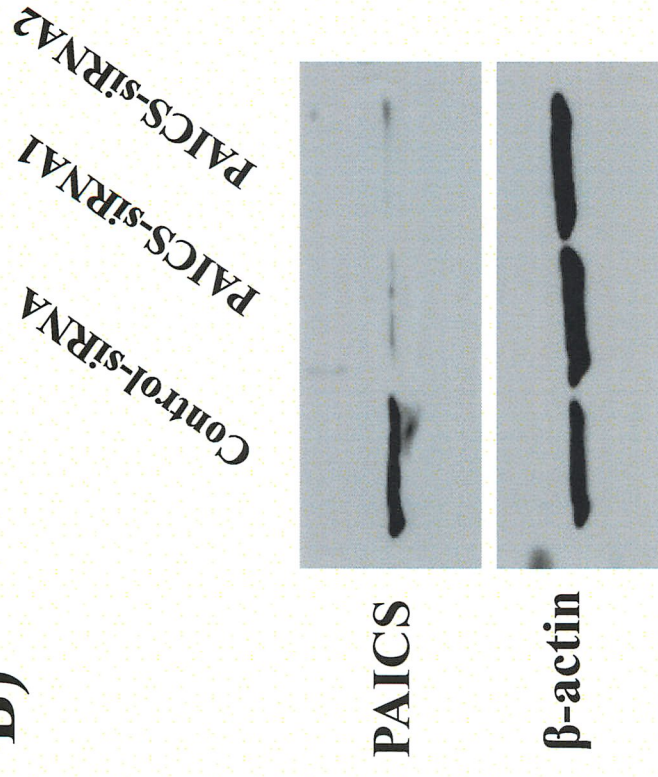


Figure 6

HCT116 PAICSSiRNA proliferation

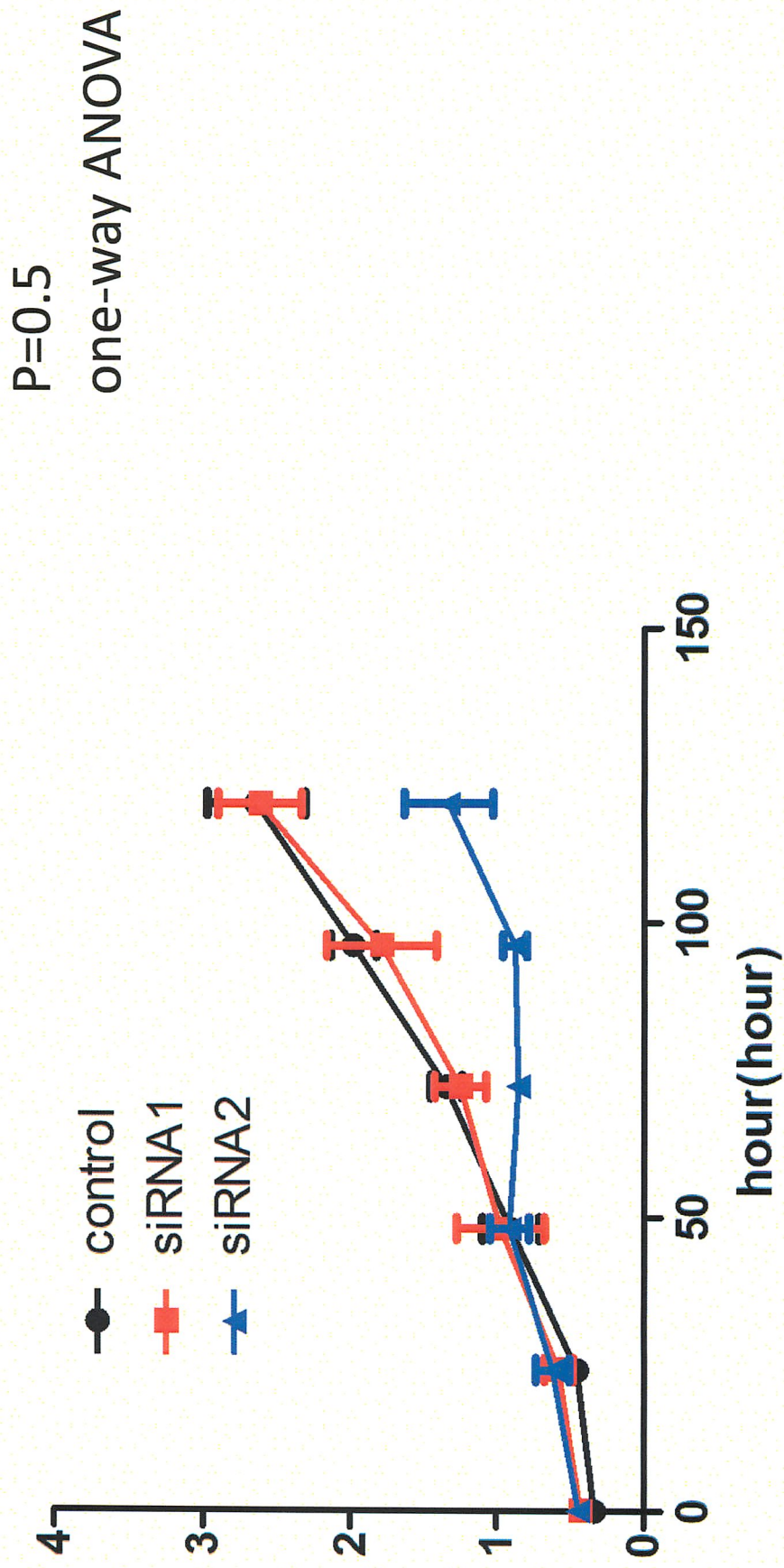


Figure 7A

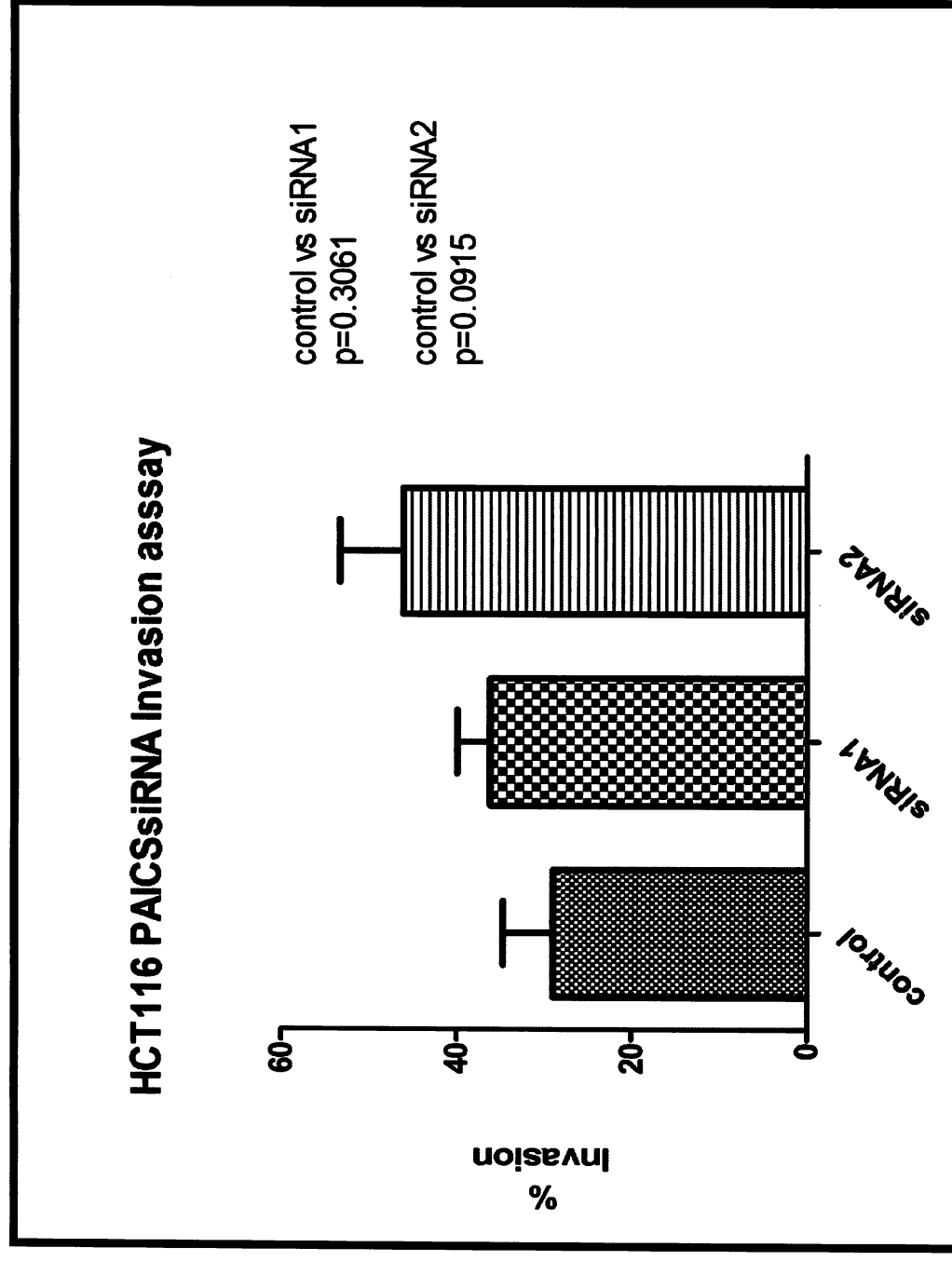


Figure 7B

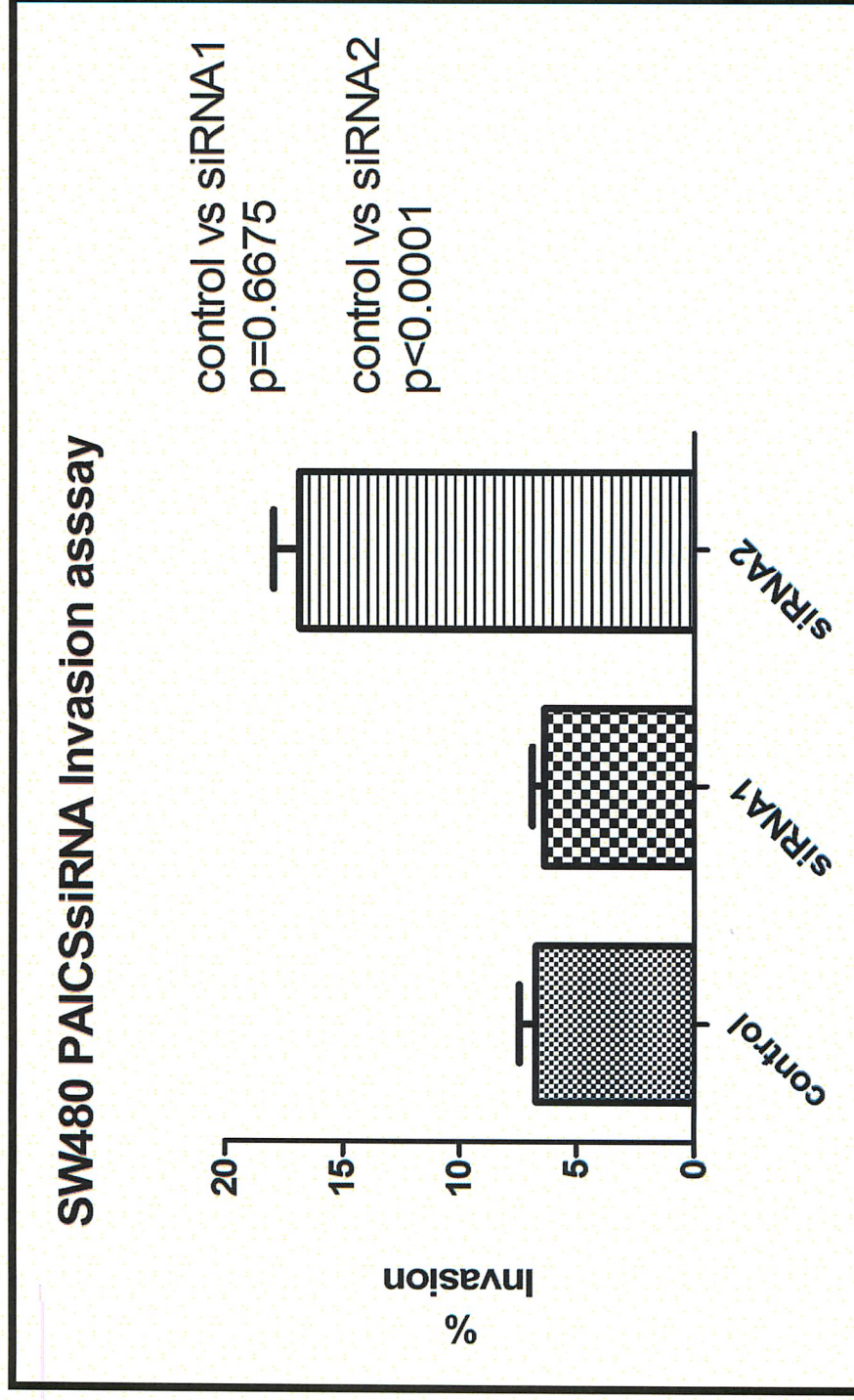


Figure 8

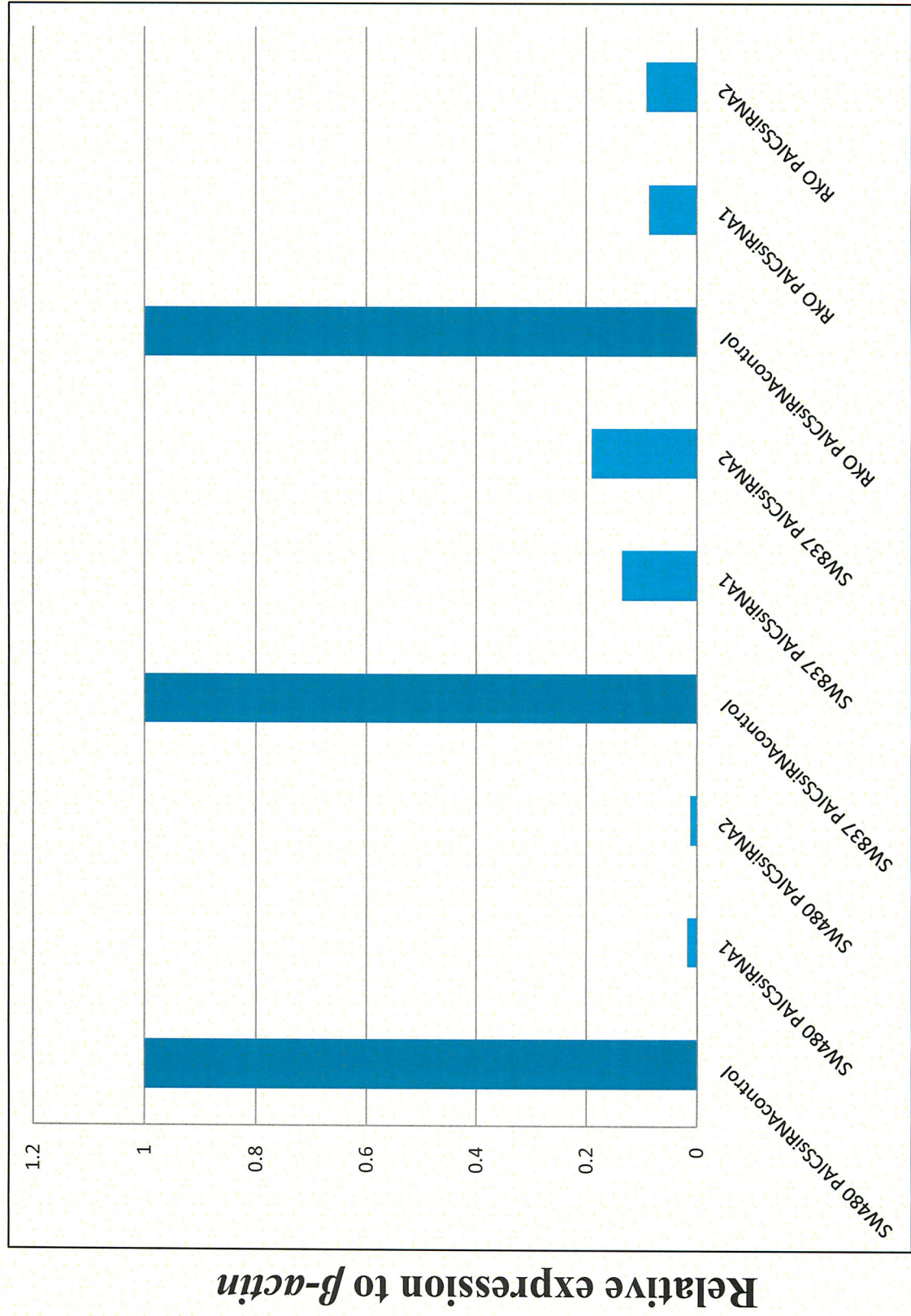
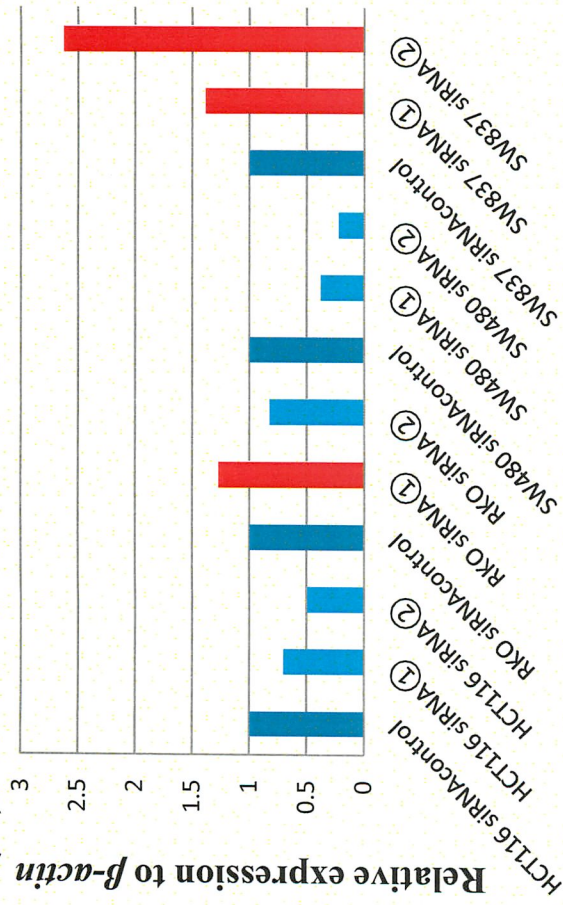
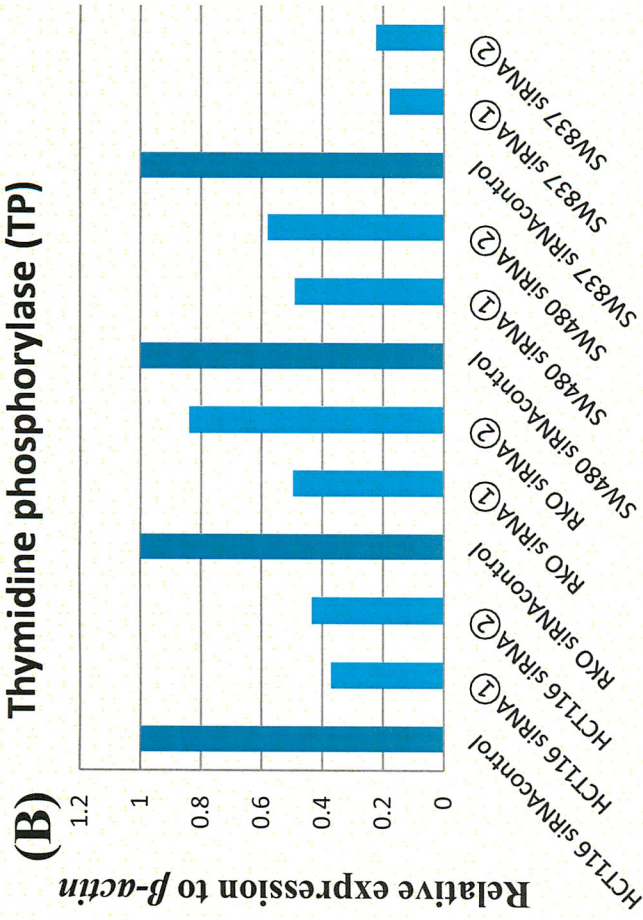


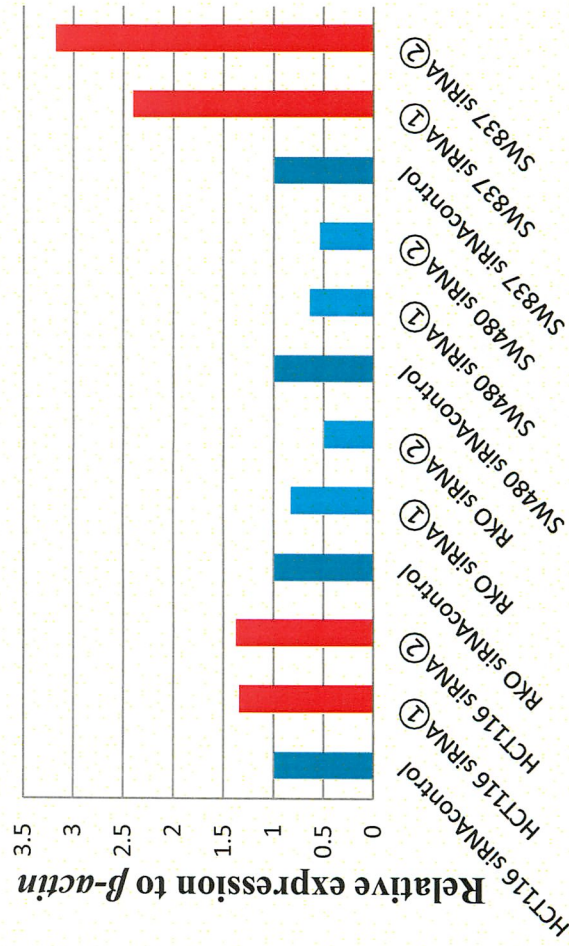
Figure 9
Thymidylate synthase (TS)



Thymidine phosphorylase (TP)



(C) Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)



(D) orotate phosphoribosyltransferase (OPRT)

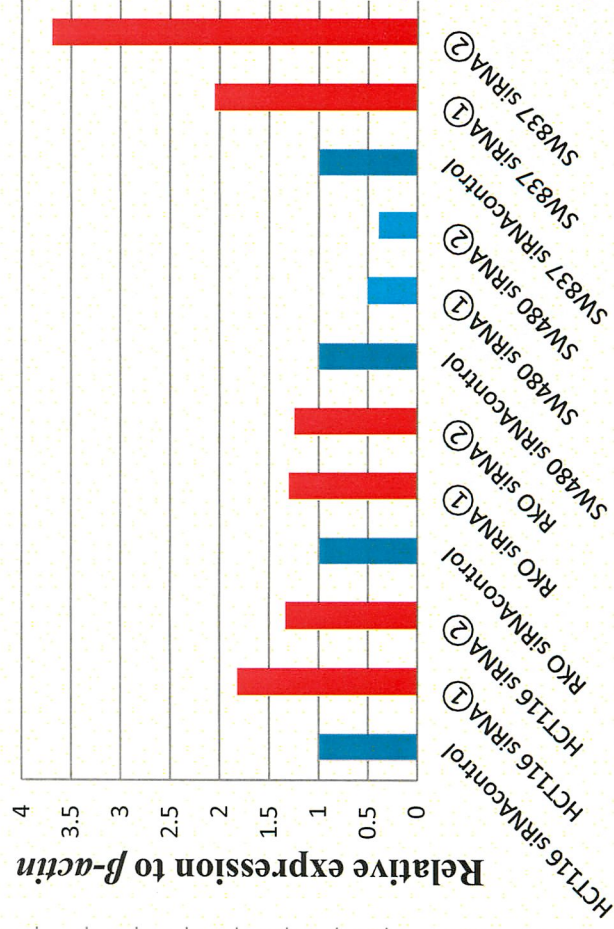


Figure 10

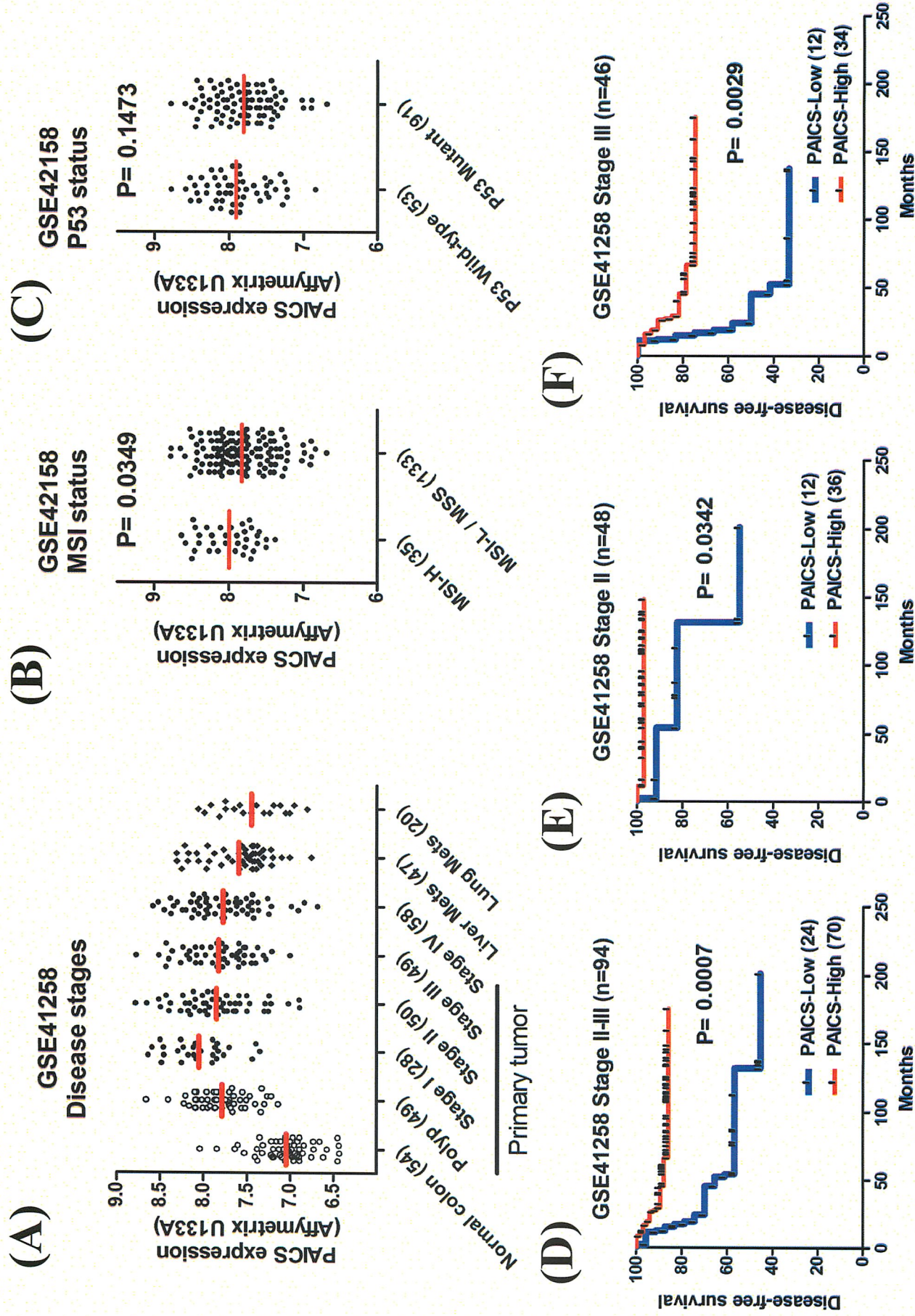


Figure 11

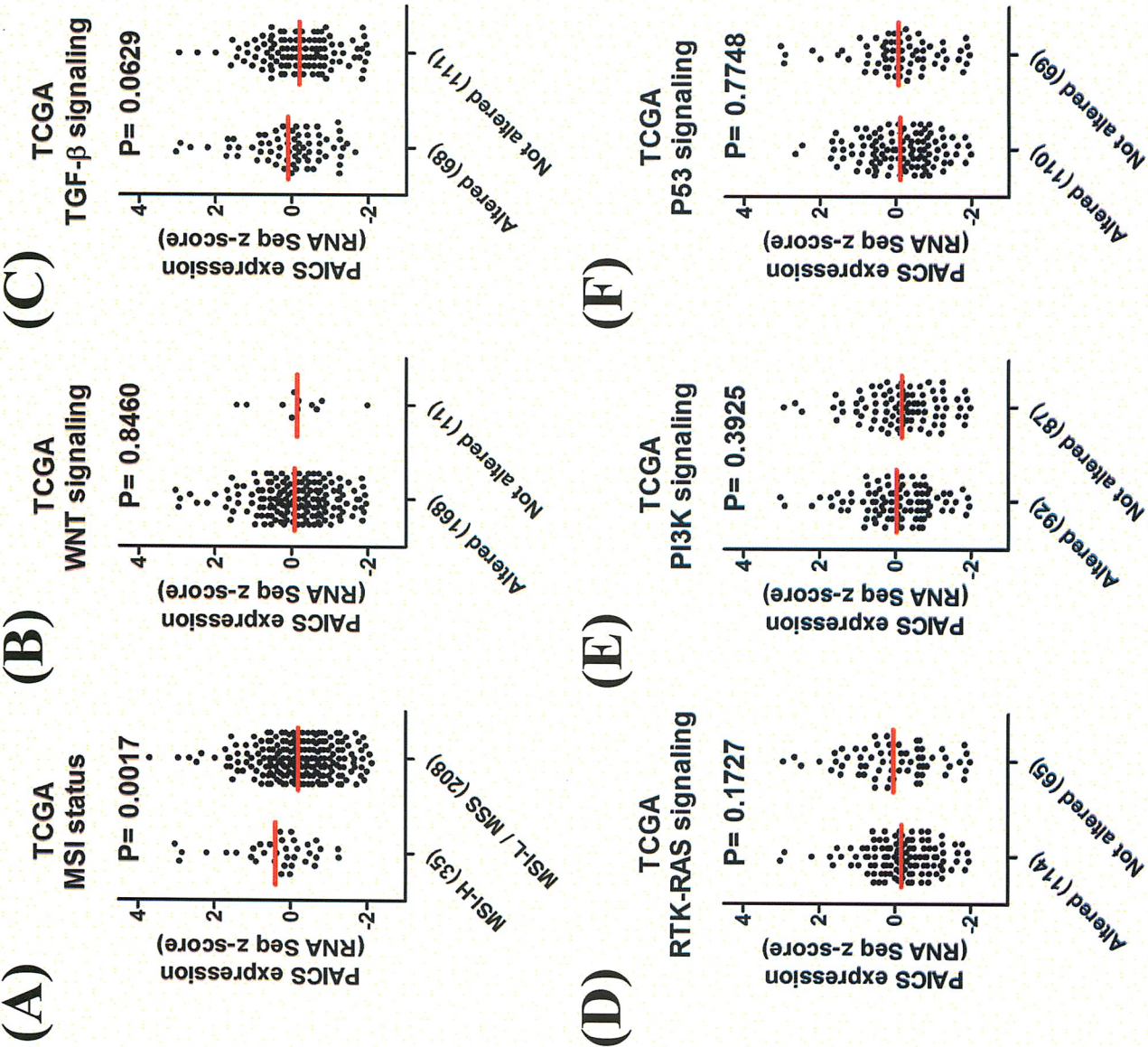


Figure 12

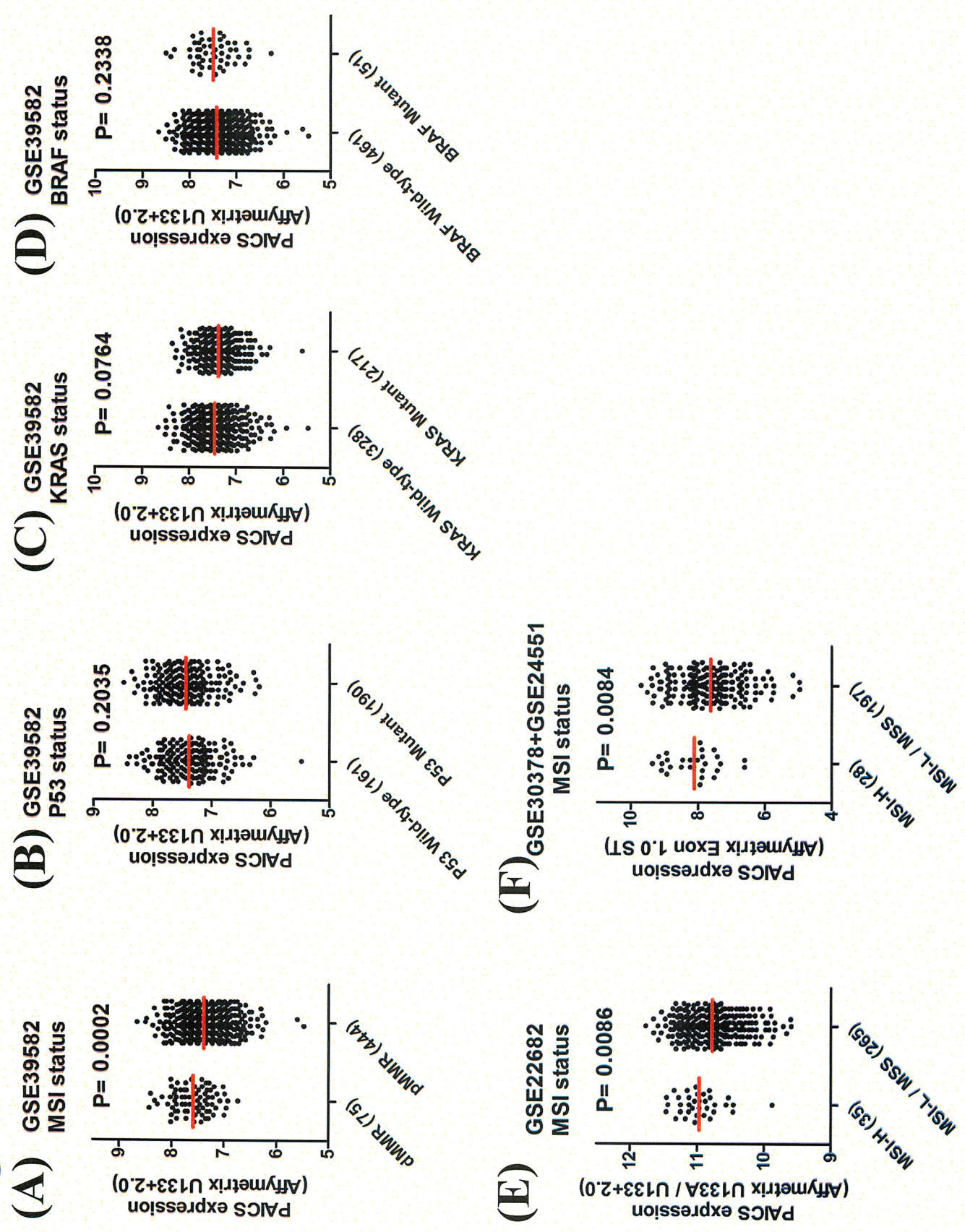
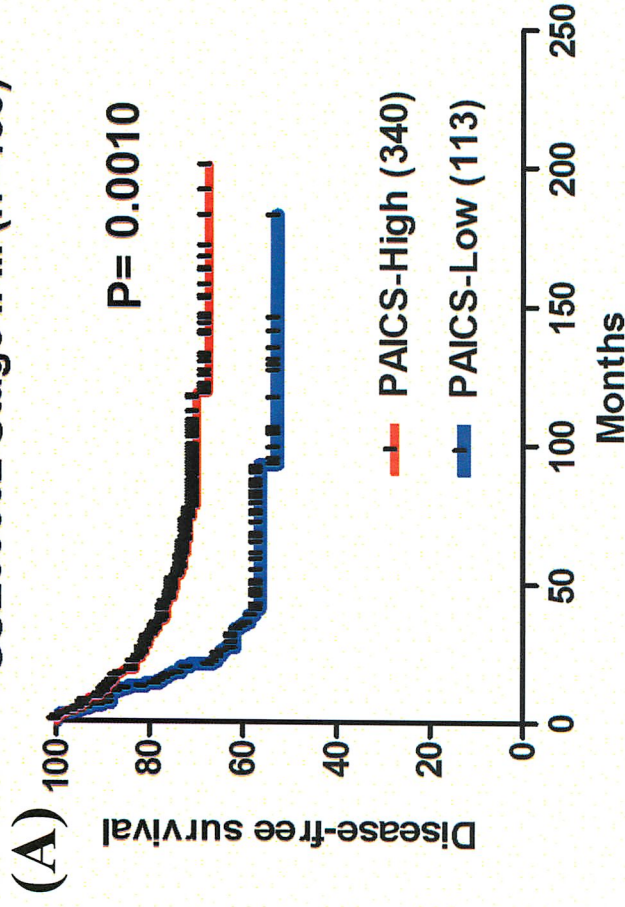
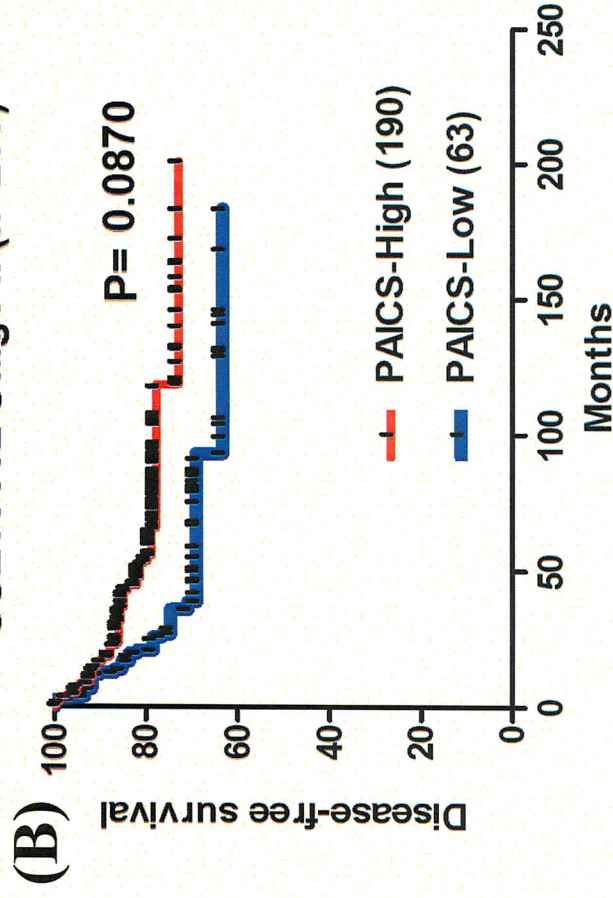


Figure 13

GSE39582 Stage II-III (n=453)



GSE39582 Stage II (n=253)



GSE39582 Stage III (n=200)

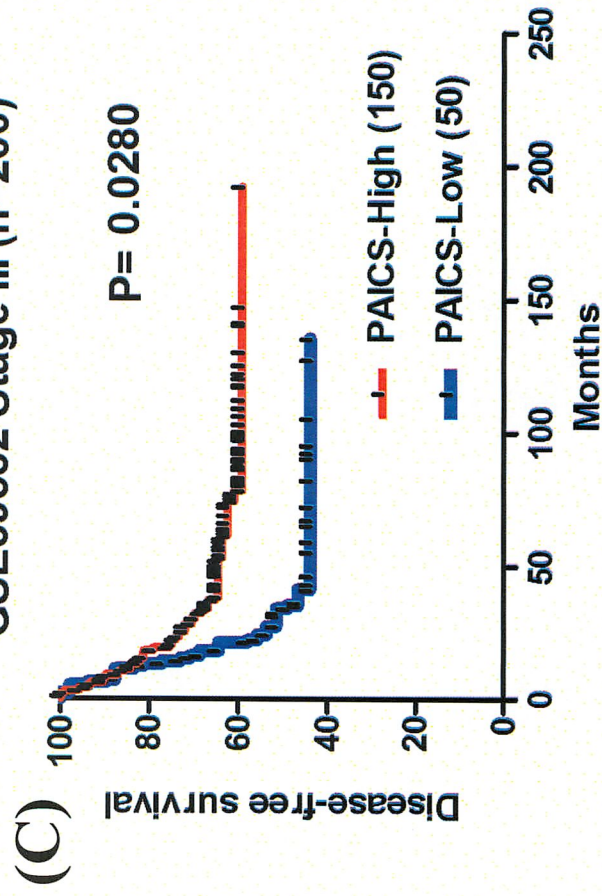
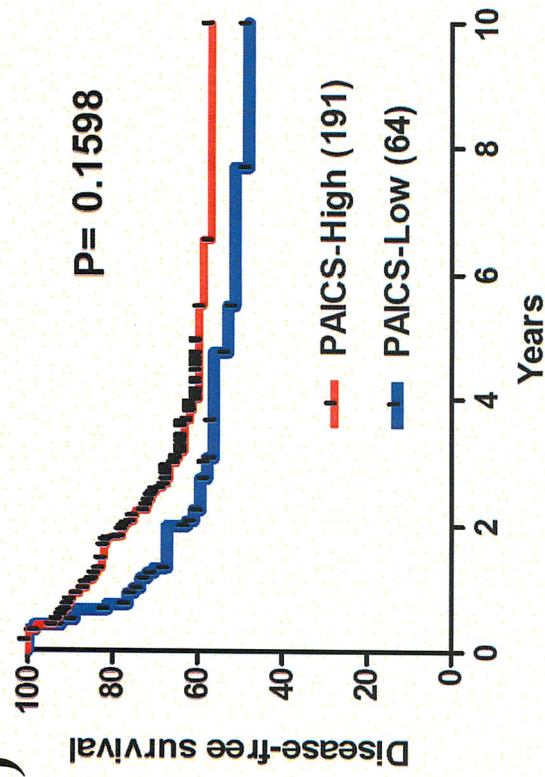


Figure 14

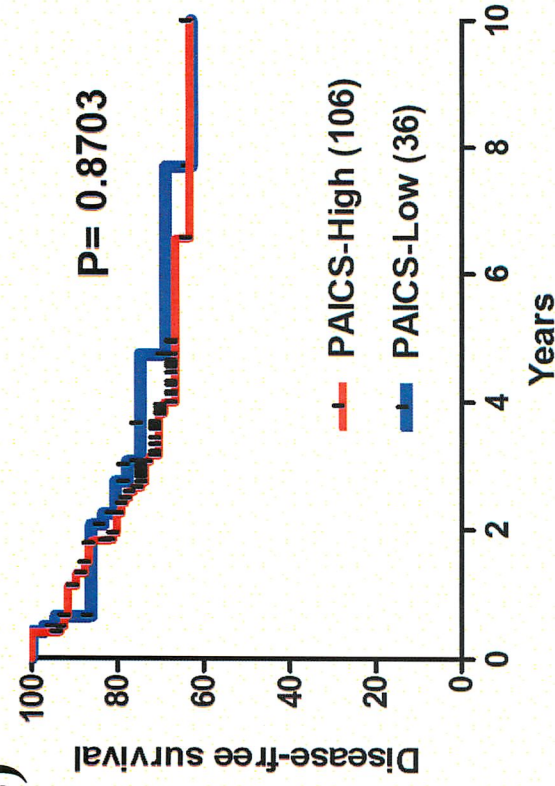
GSE30378+GSE24551 Stage II-III (n=255)

(A)



GSE30378+GSE24551 Stage II (n=142)

(B)



GSE30378+GSE24551 Stage III (n=103)

(B)

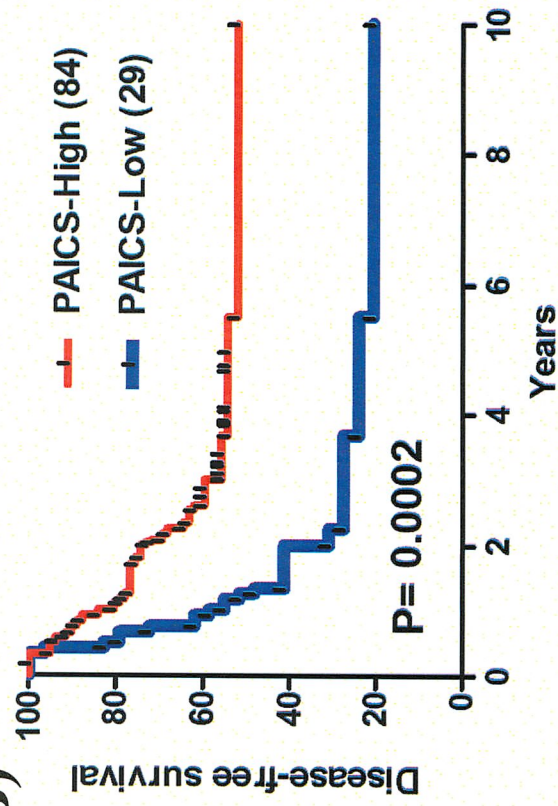


Table 1 The association between PAICS expression and clinicopathological factors in 258 colorectal cancer patients

Factor		Total (n=258)	Positive (n=142)	Negative (n=116)	P-value
Gender	Male	149	85	64	0.45
	Female	109	57	52	
Age	<65	108	59	49	0.91
	≥65	150	83	67	
Stage	0	6	1	5	0.93
	I	44	23	21	
	II	93	57	36	
	III	75	40	35	
	IV	40	21	19	
Depth	Tis	10	1	9	0.56
	T1	26	17	9	
	T2	32	18	14	
	T3	172	96	76	
	T4	18	10	8	

Factor		Total (n=258)	Positive (n=142)	Negative (n=116)	P-value
Lymph node metastasis	Positive	102	55	47	0.90
	Negative	155	86	69	
Histology	Diff	229	131	98	0.049
	Undiff	29	11	18	
	Well diff.	122	69	53	0.34
	Moderate diff.	106	61	45	
	Poorly and others	30	12	18	
Lymphatic invasion	Positive	198	108	90	0.58
	Negative	58	34	24	
Venous invasion	Positive	200	111	89	0.98
	Negative	56	31	25	
Liver metastasis	Positive	33	17	16	0.66
	Negative	225	125	100	
Tumor location	Right	86	50	36	0.48
	Left	172	92	80	